

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΖΙΖΑΝΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Πώς το πλούσιο σε κυανοτοξίνες αρδευτικό νερό επηρεάζει το σύστημα
φυτό-φυτικό προϊόν προς ανθρώπινη κατανάλωση-έντομα
αποθηκευμένων προϊόντων;

ΓΕΡΜΑΝΗ ΡΑΦΑΗΛΙΑ-ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΑ

ΒΟΛΟΣ 2018

Πώς το πλούσιο σε κυανοτοξίνες αρδευτικό νερό επηρεάζει το σύστημα φυτό-φυτικό
προϊόν προς ανθρώπινη κατανάλωση-έντομα αποθηκευμένων προϊόντων;

ΓΕΡΜΑΝΗ ΡΑΦΑΗΛΙΑ-ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Λεβίζου Ευθυμία, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας
Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια.

Αθανασίου Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Εντομολογίας, Τμήμα Γεωπονίας
Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,
Μέλος

Δαναλάτος Νικόλαος, Καθηγητής Γεωργίας - Οικολογίας Φυτών Μεγάλης
Καλλιέργειας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

Copyright © ΓΕΡΜΑΝΗ ΡΑΦΑΗΛΙΑ-ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΑ, 2018

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναγράφεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών με τίτλο «Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος» του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το θέμα της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν «Πώς το πλούσιο σε κυανοτοξίνες αρδευτικό νερό επηρεάζει το σύστημα φυτό-φυτικό προϊόν προς ανθρώπινη κατανάλωση-έντομα αποθηκευμένων προϊόντων;»

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής διατριβής μου Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Λεβίζου Ευθυμία, για την υποστήριξη και τις υποδείξεις της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποκτήσω καινούργιες εμπειρίες και να ασχοληθώ με ένα καινούργιο αντικείμενο. Επιπλέον, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για το γεγονός ότι πίστεψε σε μένα και στις δυνατότητές μου. Επίσης, ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αθανασίου, για το χρόνο που αφιέρωσε και για την καθοδήγηση του στην πορεία της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής αλλά και τον Καθηγητή κ. Δαναλάτο, για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της εργασίας αυτής.

Θα ήταν παράληψή μου να μην ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα κ. Παπαδημητρίου Θεοδότη για την πολύτιμη βοήθεια της στη μέθοδο ELISA που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα και φυσικά την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Αγραφιώτη Παρασκευή για την καθοδήγησή της στην εκπόνηση του πειράματος μου στο αντίστοιχο εργαστήριο, την κ. Σκουφογιάννη του εργαστηρίου Γεωργίας και Εφαρμοσμένης Φυσιολογίας Φυτών για την συνεχή καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την συμφοιτήτρια του εργαστηρίου Ζιζανιολογίας Εύα Τσουμαλάκου που ήταν παρούσα στις εύκολες και δύσκολες στιγμές του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τη μητέρα μου για την αδιάκοπη στήριξη της και φυσικά τον άνθρωπό μου, που με εμπιστεύτηκε και δε σταμάτησε να με στηρίζει και να με βοηθά με οποιοδήποτε τρόπο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα έρευνα καλλιέργεια αραβόσιτου (*Zea mays*) ποτίστηκε με νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες με σκοπό την μελέτη των επιδράσεων του τόσο σε αναπτυξιακές και φυσιολογικές παραμέτρους των φυτών, όσο και σε έντομα αποθηκών. Το επιβαρυμένο νερό συλλέχθηκε από τη λίμνη Κάρλα, η οποία χαρακτηρίζεται από ευτροφικές συνθήκες και αυξημένες συγκεντρώσεις μικροκυστινών που έχουν ηπατοτοξική δράση. Κατά την πειραματική διαδικασία, τα φυτά χωρίστηκαν σε δυο ομάδες, σε αυτή που αρδεύονταν με νερό βρύσης και σε αυτή που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα. Όσον αφορά τα φυτά, η πειραματική διαδικασία διήρκησε τρεις μήνες, καλύπτοντας την αναπτυξιακή περίοδο του καλαμποκιού από τη φύτευση του σπέρματος έως τη συγκομιδή στο στάδιο καρποφορίας, εφόσον ο καρπός αποτελεί το κατεξοχήν εμπορεύσιμο προϊόν. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την ανάπτυξη και την φυσιολογία των φυτών που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά της μεταχείρισης με νερό βρύσης. Οι τελικές μετρήσεις και η στατιστική ανάλυση έδειξαν ότι το νερό Κάρλας επηρέασε αρνητικά τόσο το ύψος του φυτού, τη βιομάζα φύλλων και ριζών, αλλά και την παραγωγή του τελικού προϊόντος, τόσο σε ότι αφορά τον αριθμό όσο και το βάρος των σπόρων. Επίσης, καταγράφηκαν μειώσεις στη συγκέντρωση των χλωροφυλλών και στη φωτοχημική απόδοση του PSII στα φυτά που ποτίστηκαν με νερό Κάρλας. Τα παραπάνω αποτελέσματα πιθανώς να μην είναι αποκλειστικά επιδράσεις των αυξημένων μικροκυστινών, καθώς στο νερό της Κάρλας καταγράφηκε ταυτοχρόνως και αυξημένη αλατότητα. Εντούτοις, η βιοσυσσώρευση μικροκυστινών ήταν γεγονός, καταγράφηκε τόσο στο φυτό όσο και στους σπόρους αραβόσιτου και ήταν σημαντική, όπως επιβεβαιώθηκε από τη μέθοδο ELISA. Στη συνέχεια οι σπόροι του πειράματος αλλά και σπόροι που συλλέχθηκαν από αγροτεμάχιο στην ευρύτερη περιοχή της Κάρλας χρησιμοποιήθηκαν ως τροφή στα έντομα αποθηκών *Prostephanus truncatus* και *Sitophilus zeamais*, σε σειρά πειραμάτων επιλογής και μη επιλογής. Στα πειράματα επιλογής τροφής δεν καταγράφηκε κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο προτίμησης μεταξύ σπόρων με ή χωρίς μικροκυστίνες σε κανένα από τα δύο είδη εντόμων. Τέλος, στο πείραμα μη επιλογής, στους σπόρους με μικροκυστίνες παρατηρήθηκε αυξημένη θνησιμότητα ποσοστού

80,4% για το *P. truncatus* και 97,5% για το *S. zeamais*, ενώ ο μέσος όρος παραγωγής απογόνων άγγιξε σχεδόν το μηδέν.

ABSTRACT

The main purpose of this study was to investigate the effects of cyanotoxins-rich irrigation water on growth and physiological parameters of maize, corn and stored-product insects. The degraded water was collected from Karla Lake, which is characterized by eutrophic conditions and increased hepatotoxic microcystins concentration. Plants were divided into two groups, the *Control* group which was irrigated with tap water and the *Karla* group with the lake's water. The experiment lasted three months, covering the whole growth period from the seed germination to corn production. Significant growth impairment was recorded in Karla's group compare to control, throughout the experimental period. Measurements at final harvest and the subsequent statistical analysis revealed a negative effect on height, leaf and root biomass; also the yield was decreased both in terms of number and weight of the seeds. Furthermore, the chlorophyll concentration as well as the photochemical efficiency of PSII presented a significant decrease in plants irrigated with Karla's water. The above growth results may be synergistic effects of increased microcystins concentration and salinity, since high levels of salinity were also recorded in Karla's water. Nevertheless, microcystins bioaccumulation was evident in both leaves and maize seeds, as confirmed by the ELISA method. Since the Karla treatment plants had a limited yield of seeds, insufficient to complete the second part of the experiment, maize seeds were collected from a field near the lake, in which microcystins contamination has been formerly detected. Subsequently, these seeds were used as feed in *Prostephanus truncatus* and *Sitophilus zeamais*, in a series of choice and non-choice experiments. Regarding the choice experiments, no particular pattern of preference between seeds with or without microcystins was recorded in both insect species. Finally, in the non-choice experiments, insects exposed to seeds with microcystins exhibited an increased mortality reaching 80,4% for *P. truncatus* and 97.5% for *S. zeamais*, while the mean progeny production was almost zero.

Εγώ, η Γερμάνη Ραφαηλία-Κρυσταλλία, είμαι η συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης, έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.

Η Συγγραφέας

Ως επιβλέπουσα της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα. Γερμάνη Ραφαηλία-Κρυσταλλία.

Η Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.1 Κυανοβακτήρια και κυανοτοξίνες.....	2
1.2 Λίμνη Κάρλα	8
1.3 Κυανοτοξίνες και φυτά	10
1.4 Έντομα αποθηκών.....	13
1.5 Κατηγοριοποίηση εντόμων αποθηκών	14
1.6 Επίδραση καλλιεργητικών τεχνικών στα έντομα αποθηκευμένων προϊόντων.....	15
1.7 Κυανοτοξίνες και έντομα	18
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	19
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
3.1 Φυτά.....	20
3.1.1 Πειραματικές Συνθήκες	20
3.1.2 Εδαφολογική ανάλυση και λίπανση	22
3.1.3 Ενδιάμεσες και Τελικές μετρήσεις	23
3.1.4 Προσδιορισμός χλωροφυλλών	25
3.1.5 Φυλλοδιαγνωστική	27
3.2 Έντομα.....	31
3.2.1 Βιοδοκιμές	35
3.3 Εκχύλιση μικροκυστινών από σπόρους αραβόσιτου και από νερό από τη λίμνη Κάρλα	38
3.3.1 Ενζυμοσυνδεόμενη Ανοσοπροσροφητική Τεχνική.....	38
3.4 Στατιστική ανάλυση	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
4.1 ΦΥΤΑ	42
4.1.1. Μορφολογικά – αναπτυξιακά χαρακτηριστικά.....	42
4.1.2. Τελική Συλλογή	45
4.1.3. Φυλλοδιαγνωστική	49
4.2 Ανάλυση νερού	50
4.3 Προσδιορισμός μικροκυστινών στο νερό και στους σπόρους	51
4.4 Έντομα.....	52
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κυανοβακτήρια και κυανοτοξίνες

Τα κυανοβακτήρια (cyanobacteria) κατατάσσονται στο Βασίλειο των Βακτηρίων (Van Den Hoek *et al.*, 1995; Castenholz, 2001), είναι αρνητικοί κατά Gram οργανισμοί και εμφανίζονται ως μονοκύτταρες, αποικιακές ή νηματοειδείς (απλές ή διακλαδισμένες) δομές (Fogg *et al.*, 1973).

Τα κυανοβακτήρια μπορούν να φωτοσυνθέσουν αερόβια και αναερόβια, γεγονός που τους δίνει τη δυνατότητα να αναπτυχθούν σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα, υδάτινα και χερσαία και πολλές φορές κάτω από ακραίες συνθήκες (Pearl, 1996). Τα περιβάλλοντα στα οποία απαντώνται άφθονα τα κυανοβακτήρια είναι κυρίως τα υδάτινα οικοσυστήματα κάθε τύπου. Αναπτύσσονται σε εσωτερικά ύδατα (λίμνες, ποτάμια), σε παράκτια, αλλά και ωκεάνια συστήματα, σε ψυχρές και θερμές πηγές και σε ακραία περιβάλλοντα όπου δεν επιβιώνουν άλλα μικροφύκη (Mur *et al.* 1999). Επίσης, μερικά κυανοβακτήρια παράγουν πρωτεϊνούχα αέρια κενοτόπια που τους επιτρέπουν να επιπλέουν στα υδάτινα περιβάλλοντα (Hayes, 1988).

Η παρουσία των κυανοβακτηρίων στα υδάτινα οικοσυστήματα είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον ευτροφισμό που παρατηρείται στα οικοσυστήματα αυτά, καθώς αυτοί οι οργανισμοί αποτελούν την πιο γνωστή ταξινομική ομάδα που αναπτύσσεται κάτω από ευτροφικές συνθήκες (Codd, 2000). Τόσο η εκτεταμένη χρήση των φυτοφαρμάκων και των λιπασμάτων όσο και η μη σωστή διαχείριση των οικιακών και βιομηχανικών αποβλήτων οδηγούν στην απότομη αύξηση της αφθονίας των κυανοβακτηρίων των εσωτερικών υδάτων (Whitton & Potts, 2000). Η «μαζική συσσώρευση κυανοβακτηρίων στο επιφανειακό στρώμα του νερού κατά τη διάρκεια της περιόδου που αυτά σχηματίζουν σημαντικούς πληθυσμούς» περιγράφεται με τον όρο «άνθιση» ή «κυανοβακτηριακός ανθός» (waterbloom)(Εικόνα 1). Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της άνθισης συχνά παρατηρείται ανομοιόμορφη κατανομή των κυανοβακτηριακών ανθών, οι οποίοι με τον κυματισμό του νερού δύνανται να συσσωρευτούν στην ακτή σχηματίζοντας τη

γνωστή εικόνα μιας επιφανειακής κυανοπράσινης κρούστας (scum). Σημαντικό είναι να αναφερθεί, πως παράγοντες όπως:

- η υψηλή θερμοκρασία νερού ($>20\text{ }^{\circ}\text{C}$),
- η μικρή ή μηδενική ανανέωση του νερού
- τα αυξημένα φορτία θρεπτικών και
- ο χαμηλός ατομικός λόγος ανόργανου αζώτου:φωσφόρου (<15) και το υψηλό pH (>8)



Εικόνα 1: Μαζική συσσώρευση πλαγκτικών κυανοβακτηρίων σε λίμνες γλυκού νερού. (Α) Επιβλαβής άνθιση κυανοβακτηρίων στη λίμνη του Πανεπιστημίου Chulalongkorn, Μπανγκόκ, Ταϊλάνδη, (Β) Χελώνες που επιβιώνουν σε τοξικές συνθήκες, (C) Επιβλαβής άνθιση κυανοβακτηρίων σε λίμνη στο Βαρανάσι της Ινδίας (Φωτογραφία του R.P. Rastogi).

αποτελούν τους αβιοτικούς παράγοντες που προάγουν την αύξηση και επικράτηση των κυανοβακτηρίων στο φυτοπλαγκτό (Reynolds & Walsby, 1975). Πρόσφατα, οι Molot *et al.* (2014) παρουσίασαν ένα νέο εννοιολογικό μοντέλο που συνδέει την παρουσία ανοξίας, Φωσφόρου (P), Αζώτου (N), Σιδήρου (Fe) και του θειικού άλατος με το σχηματισμό βλαβερών κυανοβακτηριακών ανθίσεων σε τρεις βαθμίδες, δηλαδή σε θρεπτικά συστατικά, αλατότητα και οξύτητα. Η συνεχής μεταφορά ιζημάτων σε ένα υδατικό σύστημα μπορεί να εμποδίσει τη φυσική ροή του νερού και να εμπλουτίσει τον διαλυμένο οργανικό άνθρακα και άλλες ενώσεις που οδηγούν σε δυνητικό κίνδυνο σχηματισμού άνθισης.

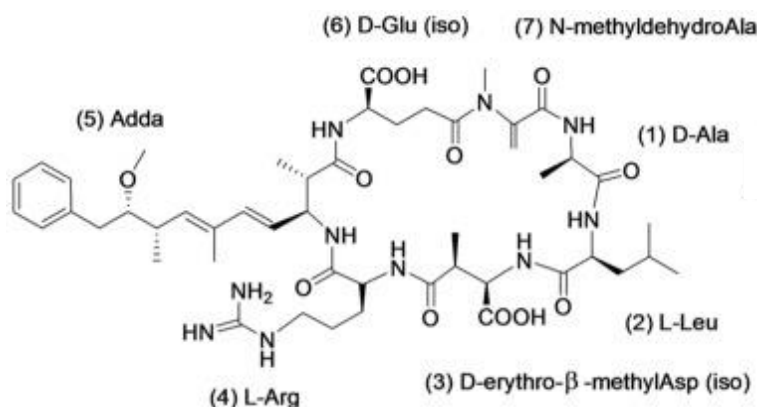
Ένας μεγάλος αριθμός ειδών και στελεχών όλων των γενών των κοινών κυανοβακτηρίων έχει την ικανότητα να παράγει τοξίνες, ως προϊόντα του μεταβολισμού του (Sivonen & Jones, 1999). Τα κυριότερα είδη κυανοβακτηρίων που παράγουν τοξίνες ανήκουν στα γένη: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* (Carmichael, 1992) και *Anabaenopsis*, *Lyngbya*, *Schizothrix*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Umezakia* και *Hapalosiphon* (Sivonen & Jones, 1999). Οι κυανοτοξίνες είναι ουσιαστικά ενδοτοξίνες που μπορούν να απελευθερωθούν στο περιβάλλον μετά από μια κυτταρική αποδιοργάνωση (Codd *et al.*, 1989). Έχει υποτεθεί ότι οι κυανοτοξίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς χημικής άμυνας που προσφέρουν πλεονεκτήματα επιβίωσης στα κυανοβακτήρια έναντι άλλων μικροβίων ή αποτρέπουν την θήρευση από υψηλότερα τροφικά επίπεδα (Vepriiskii *et al.*, 1991; Jang *et al.*, 2007; Berry *et al.*, 2008). Όμως, αυτοί οι δυνητικά τοξικοί μεταβολίτες κατά τη διάρκεια άνθισης των κυανοβακτηρίων μπορεί να έχουν επιβλαβείς επιδράσεις τόσο σε επίπεδο οικοσυστήματος όσο και στην υγεία των ζώων και των ανθρώπων. Οι κυανοτοξίνες μπορούν να προκαλέσουν διάφορες επιβλαβείς επιδράσεις είτε μέσω άμεσης επαφής είτε μέσω πρόσληψης μολυσμένου νερού και τροφίμων (Miller *et al.*, 2010; Papadimitriou *et al.*, 2012; Rastogi *et al.*, 2014; Sukenik *et al.*, 2015).

Όσον αφορά τη χημική τους δομή, οι κυανοτοξίνες υπόκεινται σε τρεις κύριες ομάδες: **κυκλικά πεπτίδια** (μικροκυστίνες και νοντουλαρίνες), **αλκαλοειδή** (ανατοξίνη-α, ανατοξίνη-α (s), σαξιτοξίνες και **λιποπολυσακχαρίτες** (Kaebernick and Neilan, 2001). Ωστόσο, με βάση τα βιολογικά αποτελέσματα, οι κυανοβακτηριακές τοξίνες μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε λειτουργικές ομάδες όπως

ηπατοτοξίνες, νευροτοξίνες, κυτοτοξίνες, δερματοτοξίνες και ερεθιστικές τοξίνες (Corbel *et al.*, 2014).

Κατά τη διάρκεια άνθισης των κυανοβακτηρίων, οι ίσως πιο συχνά συναντώμενες τοξίνες είναι οι μικροκυστίνες (MC), οι οποίες συνδέονται συχνότερα με περιστατικά δηλητηρίασης από ζώα και ανθρώπους. Το γένος *Microcystis* ανήκει στην οικογένεια *Microcystacea* Elenkin 1933. Όσον αφορά τη μορφολογία τους, το συγκεκριμένο γένος είναι το μόνο της οικογένειας χωρίς ζελατινώδη περιβλήματα γύρω από μεμονωμένα κύτταρα ή από τις μικρές ομάδες κυττάρων. Οι φυσικοί πληθυσμοί του *Microcystis spp.* αναφέρονται συχνά ως *Microcystis aeruginosa* (Komárek & Anagnostidis, 1999).

Οι MCs είναι κυκλικά επταπεπτίδια που παράγονται από διάφορα στελέχη κυανοβακτηρίων (Sivonen and Jones, 1999; Krienitz *et al.*, 2002; Izaguirre *et al.*, 2007; Aboal and Puig, 2009; Rastogi *et al.*, 2014) (Εικόνα 2) και πήραν το όνομά τους από το κυανοβακτηριακό γένος *Microcystis* από το οποίο και απομονώθηκαν για πρώτη φορά (Carmichael, 1997). Μέχρι και σήμερα υπάρχουν πάνω από 90 εκδοχές MCs, όλες όμως μοιράζονται μια βασική δομή: cyclo(D-Ala-X-D-β-MeisoAsp-Y-Adda-D-iso-GluMdha), όπου τα X και Y εκπροσωπούν διαφορετικά L-αμινοξέα. Από τα πολλά διαφορετικά είδη μικροκυστινών που αναφέρθηκαν παγκοσμίως, η μικροκυστίνη-LR είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι, εστιάζοντας στην οξεία τοξικότητα, η μικροκυστίνη-LR (MC-LR) θεωρείται η πιο ισχυρή ηπατοτοξίνη (Funari and Testai, 2008). Το πρόβλημα των μικροκυστινών ενισχύεται από τον υψηλό βαθμό της χημικής τους σταθερότητας μέσα στο νερό τόσο σε μεγάλη κλίμακα θερμοκρασιών όσο και σε pH (Percival & Williams, 2014). Επίσης, σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η βιοσυσσώρευση των μικροκυστινών έχει εντοπισθεί σε μια πληθώρα υδρόβιων και χερσαίων οργανισμών (Παπαδημητρίου, 2010).



Εικόνα 2: Χημική δομή MC-LR

Οι μικροκυστίνες φαίνεται να ευθύνονται για μια σειρά περιστατικών οξείας και χρόνιας τόσο σε ζώα όσο και στον ανθρώπινο πληθυσμό (W.H.O., 1998; Duy *et al.*, 2000; Dietrich & Hoeger, 2005). Η τιμή LD₅₀ για το σύνολο των μικροκυστινών κυμαίνεται από 50-1000 µg/kg βάρους σώματος, μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση (W.H.O., 1998). Ειδικότερα για την μικροκυστίνη-LR η τιμή LD₅₀ κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 36-122 µg/kg βάρους σώματος μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση και μεταξύ των τιμών 43-200 µg/kg βάρους σώματος έπειτα από εισπνοή της παραπάνω τοξίνης (Dawson, 1998).

Με την είσοδό τους στο κύτταρο οι μικροκυστίνες δεσμεύονται ομοιοπολικά στις πρωτεϊνικές φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης 1 και 2A (PP1, PP2A) και αναστέλλουν τη λειτουργικότητά τους (Honkanen *et al.* 1990, MacKintosh *et al.* 1990, 1995, Runnegar *et al.* 1993, Goldberg *et al.* 1995). Η αναστολή των πρωτεϊνικών φωσφατασών έχει συνέπεια τη λύση ή την απόπτωση, των ηπατικών κυττάρων (Runnegar *et al.*, 1991; Romanowska-Duda *et al.*, 2002; Dietrich & Hoeger, 2005).

Το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι είναι ένας ακόμα σημαντικός βιοχημικός μηχανισμός της τοξικότητας των μικροκυστινών (Ding & Ong, 2003). Οι μικροκυστίνες έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν τη δημιουργία ενεργών ριζών οξυγόνου (Li *et al.*, 2003), οι οποίες πιθανώς προκαλούν σημαντική κυτταρική

καταστροφή όπως η υπεροξείδωση των λιπιδικών μεμβρανών και η απόπτωση των κυττάρων (Ding & Ong, 2003).

Σημαντικό επίσης να αναφερθεί είναι ότι οι μικροκυστίνες έχουν τη δυνατότητα να βιοσυσσωρευτούν, να αυξηθούν δηλαδή προοδευτικά σε ένα οργανισμό τόσο ώστε ο ρυθμός πρόσληψής τους να ξεπερνά τον ρυθμό αποβολής τους από τον οργανισμό αυτό. Το γεγονός αυτό έχει αποδειχθεί σε μια πληθώρα υδρόβιων και χερσαίων οργανισμών (Chorus, 2001; Carmichael, 2001; Mohamed *et al.*, 2003). Η έκθεση των ζώων στις μικροκυστίνες είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί άμεσα διαμέσου της κατανάλωσης τοξικών κυανοβακτηρίων ή έμμεσα μέσω της κατανάλωσης άλλων οργανισμών επιβαρυσμένων με μικροκυστίνες (Fisher & Dietrich, 2000). Οι μικροκυστίνες επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία μέσω της χρόνιας κατάποσης επιβαρυσμένου νερού, εισπνοής σταγονιδίων, ή επαφής με τις ρινικές βλεννώδεις μεμβράνες κατά τη διάρκεια των ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων, ή μέσω της δερμικής επαφής (Falconer, 1999). Εντούτοις η κατανάλωση επιβαρυσμένων υδρόβιων οργανισμών είναι η πιο πιθανή οδός έκθεσης των ανθρώπων, καθώς καθημερινά καταναλώνονται πολλά είδη οργανισμών από εσωτερικά ύδατα που χαρακτηρίζονται από την παρουσία τοξικών κυανοβακτηρίων (Ernst *et al.*, 2005). Η ανεκτή ποσότητα των μικροκυστινών στην οποία είναι δυνατόν να εκτεθούν διάφορες ηλικιακές ομάδες ανθρώπων, χωρίς να εμφανίσουν συμπτώματα τοξίκωσης παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1). Αποδεκτό ανώτατο όριο ανθρώπινης κατανάλωσης μικροκυστινών όσον αφορά το πόσιμο νερό σε ημερήσια βάση (Tolerable Daily Intake, TDI) ορίστηκε από τον WHO (1998) : 0.04 µg MC-LR/kg bw/day .

Τέλος, η συσσώρευση κυανοτοξινών στην χερσαία τροφική αλυσίδα αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας ιδιαίτερα τα θέματα που σχετίζονται με την τύχη των κυανοτοξινών στα οικοσυστήματα του εδάφους, την τοξικότητα και τη βιοσυσσώρευση στις καλλιέργειες.

Πίνακας 1. Ποσότητα μικροκυστινών που μπορεί να προσλαμβάνεται καθημερινά (TDI) από διάφορες οδούς, χωρίς να δημιουργούνται βλάβες στην υγεία, σύμφωνα με τους υπολογισμούς του Fromme *et al.*, 2000.

Οδός λήψης τροφής	Συγκέντρωση μικροκυστινών	Βρέφη 5Kg=12.5 µg	Παιδιά 20Kg=50 µg	Ενήλικες 20Kg=50 µg
Υδρόβιοι οργανισμοί	100 µg Kg ⁻¹	125g	500g	1500g
	1000 µg Kg ⁻¹	1.25g	5g	15g
Μάζα κυανοβακτηρίων στη λίμνη	100 µg l ⁻¹	125ml	500ml	1500ml
	1000 µg l ⁻¹	12.5ml	50ml	150ml
Πόσιμο νερό	1.0 µg l ⁻¹	12.500ml	50.000ml	150000ml
	100 µg l ⁻¹	125ml	500ml	1500ml

1.2 Λίμνη Κάρλα

Η ανασυγκρότηση της λίμνης Κάρλας αναφέρεται ως το σημαντικότερο ευρωπαϊκό περιβαλλοντικό έργο όσον αφορά τα περιβαλλοντικά οφέλη αλλά και το οικονομικό κόστος (Gialis and Laspidou, 2014). Η ανάγκη για την αντιπλημμυρική προστασία της περιοχής και η απόκτηση γεωργικών εκτάσεων, αποτέλεσαν την αιτία για να εκπονηθούν μελέτες αποστράγγισης της λίμνης το 1962 και τη δημιουργία ενός μικρότερου ταμιευτήρα σε τμήμα της το 2010. Ο ανασυγκροτημένος ταμιευτήρας βρίσκεται στην περιοχή της Θεσσαλίας, στην Κεντρική Ελλάδα, η οποία είναι μία από τις πιο παραγωγικές αγροτικές περιοχές της Ελλάδας. Σύμφωνα με το σχέδιο κατανομής και διαχείρισης του νερού, ένα δίκτυο άρδευσης που θα προμηθεύσει τους αγρότες με νερό από τη λίμνη, ενώ η χρήση δεξαμενών για πόσιμο νερό είναι ο τελικός στόχος αυτού του έργου ανασυγκρότησης της λίμνης βρίσκεται στα άμεσα σχέδια (Levizou *et al.*, 2017). Σημαντικό θα ήταν να αναφερθεί ότι, ο ταμιευτήρας της Κάρλας ανήκει στο οικολογικό δίκτυο Natura 2000 και έχει χαρακτηριστεί Μόνιμο καταφύγιο άγριας ζωής (ΦΕΚ459/2010). Είναι περιοχή μεγάλης σημασίας για τα μεταναστευτικά, τα διαχειμάζοντα και τα αναπαραγόμενα υδρόβια, παρυδάτια, αρπακτικά και είδη των

ανοιχτών εκτάσεων (Χριστόπουλος, 2009). Όμως, η λίμνη Κάρλα έχει ήδη επηρεαστεί αρνητικά από τη γεωργική και βιομηχανική ρύπανση της γύρω περιοχής (Papadimitriou *et al.*, 2016). Η λίμνη λειτουργεί ως αποδέκτης λιπασμάτων και γεωργικών αποβλήτων, λόγω της κακής ποιότητας και οικολογικής κατάστασης του νερού από τον Πηνειό ποταμό, σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες και την ηλιακή ακτινοβολία καθ' όλη τη διάρκεια του έτους αυξάνεται ο ρυθμός εξάτμισης και με την τεκμηριωμένη παρουσία τοξικών κυανοβακτηρίων (*Planktothrix cf. agardhii*, *Anabaena sp.*, και *Anabaenopsis elenkinii* κατά το πρώτο έτος επαναπλήρωσης του ταμιευτήρα της Κάρλας) (Οικονομού *et al.*, 2012) οδηγώντας μεγάλο αριθμό ψαριών στο θάνατο αλλά και πουλιών (Papadimitriou *et al.*, 2017) (Εικόνα 3). Επιπλέον, σύμφωνα με τη Χαμόγλου (2013) η συγκέντρωση των συνολικών μικροκυστινών στη λίμνη Κάρλα κυμάνθηκε από 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ έως 9,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ αλλά και με τους Papadimitriou *et. al* (2013) που κυμαίνονταν από 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ μέχρι 33 $\mu\text{g L}^{-1}$.



Εικόνα 3: Νεκροί Αργυροπελεκάνοι (*Pelecanus crispus*) στη λίμνη Κάρλα.

1.3 Κυανοτοξίνες και φυτά

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι τοξίνες που παράγονται από κυανοβακτήρια μπορούν να αποτελέσουν σημαντικό πρόβλημα στον τομέα της αλιείας, της υδατοκαλλιέργειας, της γεωργίας και φυσικά της ανθρώπινης υγείας. Ως εκ τούτου, σε πολλές χώρες πραγματοποιήθηκαν έρευνες για τα κυανοβακτήρια και τα παράγωγά τους, με στόχο την αποφυγή υγειονομικών κινδύνων από την ασφαλή χρήση νερού μολυσμένου με κυανοτοξίνες (Chorus and Bartram, 1999). Ωστόσο, έλεγχος των κυανοτοξινών στο νερό το οποίο χρησιμοποιείται για την άρδευση των καλλιεργειών δεν έχει ενταχθεί σε κάποιο πρόγραμμα παρακολούθησης της ποιότητας των υδάτων, παρόλο που τα εδώδιμα φυτά συνιστούν μια σημαντική έμμεση οδό έκθεσης του ανθρώπου στις τοξίνες των κυανοβακτηρίων.

Επιπλέον, είναι γεγονός ότι, τα τελευταία χρόνια διερευνήθηκαν αρκετές τοξίνες κυανοβακτηρίων όσον αφορά την ικανότητά τους να εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα μέσω θαλασσινών γλυκού νερού (Ibelings and Chorus, 2007; Ettoumi *et al.*, 2011), αλλά η ικανότητά τους να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα μέσω τροφίμων αγροτικής προέλευσης δεν έχει διερευνηθεί πλήρως μέχρι σήμερα. Μια επιδημιολογική μελέτη που διεξήχθη, παρουσίασε πως στα νησιά Guam παρατηρήθηκε υπερβολική συχνότητα εμφάνισης μιας νευρολογικής φύσεως ασθένειας, που συνδέθηκε με την κατανάλωση σπόρων cycas, τα οποία είχαν μολυνθεί από μια νευροτοξίνη, του γένους *Nostoc* που ζει συμβιωτικά στις ρίζες του φυτού αυτού (Banack and Cox, 2003; Cox *et al.*, 2003; Murch *et al.*, 2004; Steele and McGeer, 2008).

Δημοσιευμένες μελέτες δείχνουν σαφώς ότι η άρδευση με νερό που περιέχει μικροκυστίνες μπορεί να αποτελέσει απειλή τόσο για την ποιότητα όσο και για την απόδοση των καλλιεργούμενων φυτών. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την ανάγκη να εξεταστεί το όριο των MC που ενδέχεται να είναι επιζήμιο τόσο για τις καλλιέργειες (Pflugmacher *et al.*, 2006; Crush *et al.*, 2008) όσο και για τον άνθρωπο. Το 1995, οι Kos *et al.* ανέφεραν για πρώτη φορά ότι τόσο οι MCs όσο και τα ακατέργαστα εκχυλίσματα κυανοβακτηρίων που περιέχουν MC ανέστειλαν την ανάπτυξη σπορόφυτα σιναπιού. Έκτοτε, το ερευνητικό ενδιαφέρον για τις φυτοτοξικές επιδράσεις των κυανοβακτηρίων στα χερσαία φυτά έχει αυξηθεί,

δείχνοντας μορφολογικές και φυσιολογικές μεταβολές από κυανοτοξίνες σε μια σειρά χερσαίων φυτών (Kos *et al.*, 1995; McElhiney *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004). Γενικά, έπειτα από έρευνες, φαίνεται πως στα φυτικά κύτταρα οι μικροκυστίνες μπορούν να διασχίσουν τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω της διάχυσης ή μέσω της απορρόφησης των ριζών. Η κύρια οδός πρόσληψης φαίνεται να είναι ο βλαστός και το ρίζωμα, από τα οποία η τοξίνη μεταφέρεται στα υπόλοιπα μέρη του φυτού. Η πρόσληψη απευθείας μέσω των φύλλων μπορεί επίσης να συμβεί με άμεση επαφή μικρών φυτών είτε τα χαμηλότερα φύλλα ενός φυτού με επιφανειακό νερό και τα άνω φύλλα με ψεκασμό (Pflugmacher *et al.*, 2001).

Ο Codd *et al.* (1999) ανέφεραν ότι η άρδευση με ψεκασμό σε φυτά μαρουλιού (*Lactuca sativa*) με νερό που περιείχε μικροκυστίνες είχε σαν αποτέλεσμα την εύρεση αποικιών και απομονωμένων κυττάρων κυανοβακτηρίου στα φύλλα του φυτού 10 ημέρες μετά την τελευταία άρδευση. Παρόμοια συμπεράσματα διεξήχθησαν για τα είδη: *Oryza sativa* και *Brassica napus* (Chen *et al.*, 2004).

Όσον αφορά την επίδραση των μικροκυστινών στα φυτά, είναι γνωστό ότι επηρεάζουν πολλές διαδικασίες σε φυτικούς ιστούς και έχουν σημαντικές και καλά τεκμηριωμένες επιπτώσεις στην ανάπτυξη και ανάπτυξη ορισμένων καλλιεργειών. Κάποιες από αυτές είναι: παρεμπόδιση βλάστησης των σπόρων, μειωμένη ανάπτυξη ριζών, δυσμενή αποτελέσματα τόσο στην ανάπτυξη των φυτών όσο και στην απόδοση των καλλιεργειών, πρόκληση οξειδωτικού stress και η υπεροξείδωση των λιπιδίων (Pflugmacher *et al.* 2007a; Saqrane *et al.* 2008; Peuthert and Pflugmacher 2010; Prieto *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012). Επιπλέον, ανιχνεύτηκε μειωμένη φωτοσυνθετική απόδοση, η οποία προκύπτει από τη φωτοχημική απόδοση του PSII εξαιτίας της παρουσίας μικροκυστινών (El Khalloufi *et al.* 2011, 2012; Saqrane *et al.* 2009) και εν μέρει αποδίδεται σε μειωμένη περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη. Σε υποκυτταρικό επίπεδο, έρευνα σχετικά με μεριστώματα ριζών που έχουν υποστεί μεταχείριση με μικροκυστίνες, παρουσίασε μεταβολές στη μιτωτική δραστηριότητα, οι οποίες σχετίζονται με μεταβολές στη χρωματίνη, γεγονός που υποδεικνύει μια παρέμβαση των τοξινών με τη ρύθμιση του κύκλου των φυτικών κυττάρων (Beyer *et al.*, 2012).

Μετά από έκθεση φυτών σε MCs εξαιτίας της άρδευσης με μολυσμένο νερό, τα φυτά παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα τους. Οι ROS έχουν ισχυρή αντιδραστικότητα και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλες κυτταρικές ενώσεις (λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA). Τα φυτά έχουν αντιοξειδωτικά συστήματα που θα περιορίσουν τις αρνητικές επιδράσεις που προκαλούνται από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου όπως η γλουταθειόνη S-τρανσφεράση (GST), η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση (POD) και η καταλάση (CAT) (Pflugmacher *et al*, 2006). Στη συγκεκριμένη έρευνα, παρατηρήθηκε αναστολή της βλάστησης και της ανάπτυξης των ριζών σε φυτά μηδικής (*Medicago sativa*) έπειτα από έκθεση σε συγκέντρωση μικροκυστίνης και ατανοξίνης-α 5,0 $\mu\text{g} / \text{L}$. Επίσης, η οξειδωτική βλάβη, όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων, ανιχνεύθηκε μετά την έκθεση των σπόρων της μηδικής στη τοξίνη.

Οι Saqrane *et. al* (2009) εξέτασαν τις φυσιολογικές μεταβολές που προκλήθηκαν στα φυτά: *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* και σε ποικιλίες του *Lens esculenta*, οι οποίες προκλήθηκαν από νερό επιμολυσμένο με μικροκυστίνες. Έπειτα από έκθεση 30 ημερών, το εκχύλισμα μικροκυστινών φαίνεται να προκάλεσε στα υπό μελέτη φυτά, μειωμένη ανάπτυξη και παραγωγικότητα, καθώς και επιβλαβείς επιδράσεις στην ανάπτυξη και στη λειτουργία του PSII, γεγονός που εκφράστηκε σύμφωνα με τον λόγο Fv / Fm κατά τη μέτρηση του φθορισμού της χλωροφύλλης. Παρ'όλα αυτά η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη δεν παρουσίασε διαφορές και η συσσώρευση Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , P και N βελτιώθηκε.

Επίσης, ο Pflugmacher (2007) διερεύνησε την βλαστικότητα σπόρων αραβόσιτου (*Zea mays*), οι οποίοι εκτέθηκαν σε διαφορετικής αναλογίας μικροκυστίνες και σε εκχύλισμα κυανοβακτηρίων που δεν έχει υποστεί κατεργασία που δεν περιείχε τοξικά κύτταρα. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις μικροκυστίνες στη μελέτη αυτή ήταν 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ το ποσοστό της οποίας προσομοίαζε σε περιβαλλοντικές συνθήκες. Παρατηρήθηκε αναστολή της βλάστησης, καθώς και του μήκους των ριζών και των βλαστών έπειτα από την έκθεση στην τοξίνη.

1.4 Έντομα αποθηκών

«Έντομο αποθηκών» θεωρείται κάθε είδος εντόμου που προσβάλλει και ζημιώνει ένα προϊόν και μπορεί να αναπτυχθεί και να αναπαραχθεί σε ένα χώρο που φιλοξενεί για αρκετό χρονικό διάστημα γεωργικά προϊόντα ή τρόφιμα» (Μπουχέλος, 1996). Η προσβολή μπορεί να γίνει αποκλειστικά στην αποθήκη, αλλά δεν είναι σπάνιες και οι περιπτώσεις όπου η πρωτογενής προσβολή γίνεται στον αγρό και κατόπιν τα έντομα συνεχίζουν και ολοκληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο στο αποθηκευμένο προϊόν (Σταμόπουλος, 1999). Αξίζει να σημειωθεί ότι κάθε είδος εντόμου μπορεί να προκαλέσει ζημιά και να καταστήσει τον εαυτό του επικίνδυνο για την αγροτική παραγωγή κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες, περιβάλλοντος και είδους και επάρκειας τροφής (Aitken, 1975).

Τα εντόμων αποθηκών διακρίνονται από μεγάλη και ταχύτατη εξάπλωσή, αλλά και από πολλές γενεές το χρόνο με παράλληλη προσβολή μεγάλης ποσότητας σπόρων και συναφών προϊόντων από ένα άτομο (Μπουχέλος, 1985). Επιπλέον, από εξελικτικής άποψης θεωρούνται ιδιαίτερα πετυχημένοι οργανισμοί εξαιτίας, του μικρού μεγέθους που τα διακρίνει. Δεδομένου του ότι το μέγεθος τους δεν ξεπερνάει τα 5 mm, τα έντομα αποθηκών έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιούν σειρά καταφυγίων για να επιζούν για πολλά χρόνια, αλλά και να αποφεύγουν την άμεση έκθεση σε εντομοκτόνα και φυσικούς εχθρούς. Τέλος, λόγω της μεγάλης προσαρμοστικότητας σε ποικίλες κλιματικές συνθήκες, τα πιο πολλά από αυτά, είναι παμφάγα και κοσμοπολίτικα έντομα, τα οποία μεταφέρονται μέσω του διεθνούς εμπορίου με το προϊόν σε όλα τα μέρη του κόσμου (Σταμόπουλος, 1999).

Τα έντομα αποθηκών εισέρχονται στους αποθηκευτικούς χώρους με τα αγροτικά προϊόντα από τον αγρό σε άδεια αποθήκη (κύρια μόλυνση), με τοποθέτηση προσβεβλημένου προϊόντος σε αποθήκη που φέρει καθαρό προϊόν (δευτερεύουσα μόλυνση) και με είσοδο εντόμων εντός της αποθήκης (εισβολή) από μη σωστά προστατευόμενα σημεία (π.χ. θύρες εξαερισμού χωρίς κατάλληλο πλέγμα) (Μπουχέλος, 1985).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι απώλειες των δημητριακών κατά την αποθήκευση αγγίζουν το 17% στις ανεπτυγμένες χώρες και το 30% στις αναπτυσσόμενες (Food & Agricultural Organization, 2009), ενώ παράλληλα 842

εκατομμύρια άνθρωποι υποσιτίζονται σε παγκόσμιο επίπεδο (Food & Agricultural Organization, 2013). Κύριοι υπαίτιοι για τις ανωτέρω απώλειες είναι τα έντομα αποθηκών με ποσοστό της τάξης του 59% επί των συνολικών απωλειών (Aitken, 1975).

Όμως, φαίνεται πως εκτός της ποιοτικής ζημιάς και ποσοτικής υποβάθμισης που προκαλούν στα γεωργικά προϊόντα, τα έντομα αποθηκών μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στην υγεία του προσωπικού που δραστηριοποιείται στα διάφορα στάδια επεξεργασίας αυτών, ενώ μπορεί να επιφέρουν και αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των καταναλωτών. Ενδεικτικά, αναφέρονται αλλεργικά φαινόμενα και δερματικές παθήσεις που συνδέονται με παρουσία τμημάτων του σώματος των εντόμων (πτερύγων, ποδιών κ.α.) εντός επεξεργασμένων προϊόντων (Bernton and Brown, 1964).

1.5 Κατηγοριοποίηση εντόμων αποθηκών

Η πλειοψηφία των επιβλαβών εντόμων στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα, προσβάλλουν χωρίς ιδιαίτερη διάκριση και εκλεκτικότητα όσον αφορά το είδος του προϊόντος που προσβάλλουν. Τα είδη των εντόμων αυτών ανήκουν στην κατηγορία των πολυφάγων εντόμων όπως είναι το Λεπιδόπτερο *Plodia interpunctella* αλλά και τα είδη του γένους *Ephestia* που προσβάλλουν πληθώρα προϊόντων όπως: άλευρα, σπόρους δημητριακών, σύκα, σταφίδες, καπνό, κακάο κ.α.

Αντίθετα, άλλα είδη εντόμων εμφανίζουν σχετική εκλεκτικότητα και παρουσιάζουν εξειδικευμένη συμπεριφορά όσον αφορά την τροφή τους, που στην περίπτωση αυτή είναι περιορισμένη σε ποικιλία δεδομένου ότι προσβάλλουν αποκλειστικά καρπούς ενός συγκεκριμένου είδους ή οικογένειας. Τα είδη αυτά κατατάσσονται στα ολιγοφάγα έντομα, όπως είναι τα Κολεόπτερα της οικογένειας *Bruchidae* που προσβάλλουν μόνο καρπούς ψυχανθών.

Παρ' όλο που τα έντομα αποθηκών είναι πολυφάγα, η πλειοψηφία μπορεί να επιδεικνύουν, κατά μεγαλύτερο ή μικρότερο ποσοστό, μία προτίμηση ανάμεσα σε κάποια γεωργικά προϊόντα ή ακόμα και για την κατάσταση του γεωργικού

προϊόντος. Σημαντικό θα ήταν να αναφερθεί, πως η κατάσταση του προϊόντος αυτού παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και το αναπαραγωγικό δυναμικό τους. Συνεπώς, προκειμένου να μελετήσουμε εκτενέστερα τα έντομα των αποθηκευμένων προϊόντων, προβαίνουμε σε μια κατάταξη τους σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα όχι μόνο με το είδος (πολυφάγα/ολιγοφάγα), αλλά και με τη φύση του προϊόντος που προσβάλλουν, χωρίς βέβαια αυτό να σημαίνει απόλυτη διαφοροποίηση.

Συνεπώς, έντομα που προσβάλλουν ακέραιο προϊόν πχ. σπόρους, τρέφονται με αυτόν, αλλά και ολοκληρώνουν τον βιολογικό κύκλο τους μέσα σε ένα μόνο σπόρο, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το *Sitophilus granarius*(F), το *Rhyzopertha dominica*(Olivier) και το *Sitotroga cerealella* καλούνται **πρωτεύοντα είδη** (primary pests), ενώ έντομα που προσβάλλουν προϊόν ήδη προσβεβλημένο ή μηχανικά σπασμένο (πχ. άλευρα) όπως το *Tribolium confusum* και το *Oryzaephilus surinamensis*, ονομάζονται **δευτερεύοντα είδη** (secondary pests). Γεγονός είναι ότι, υπάρχουν και μυκητοφάγα είδη (fungus feeders), τα οποία είναι έντομα των οικογενειών Mycetophagidae και Cryptophagidae και τρέφονται από μύκητες αποτελώντας δείκτες κακής υγιεινής του χώρου και του προϊόντος. Τέλος, έντομα που τρέφονται από αποσυντιθέμενες ύλες ζωικής ή φυτικής προέλευσης, τα οποία μπορεί να είναι και μυκητοφάγα, καλούνται αποσυνθέτες (scavengers) και ανήκουν κυρίως στην οικογένεια Dermestidae (Aitken, 1975).

1.6 Επίδραση καλλιεργητικών τεχνικών στα έντομα αποθηκευμένων προϊόντων

Η επίδραση της διαχείρισης μιας καλλιέργειας (βιολογική, ολοκληρωμένη κτλ.) στη θνησιμότητα, στη παραγωγή απογόνων αλλά και στη «προτίμηση» από έντομα αποθηκών φαίνεται να έχει απασχολήσει τον αντίστοιχο επιστημονικό χώρο με αποτέλεσμα οι έρευνες να συνεχίζονται ακόμα. Δημοσιευμένη έρευνα για είδη του γένους *Sitophilus* σχετικά με τη θνησιμότητα και τα ποσοστά απογόνων επικεντρώθηκε κυρίως στην επίδραση των χημικών ή μη χημικών μεθόδων ελέγχου μετά τη συγκομιδή εναντίον αυτών των ειδών (Laznik *et al.*, 2010; Rojht *et al.*, 2010;

Laznik *et al.*, 2012; Doumbia *et al.*, 2014; Kavallieratos *et al.*, 2015). Επιπλέον, έρευνα για τη συμπεριφορά του γένους *Sitophilus* επικεντρώθηκε κυρίως στην παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων πτητικών ή συναφών στοιχείων που υπάρχουν στους σπόρους σε σχέση με την επιμόλυνση στους σπόρους (Germinara *et al.*, 2008; Trematerra *et al.*, 2013). Προηγούμενες μελέτες κατέδειξαν σαφώς ότι μεταχειρίσεις όπως σπόροι που βρίσκονται σε αποσύνθεση ή σπόροι που έχουν υποστεί διάσπαση αλλά και ήδη επιμολυσμένοι σπόροι από έντομα προκάλεσαν συγκεκριμένες αποκρίσεις συμπεριφοράς σε έντομα αποθηκευμένων προϊόντων οι οποίες μπορούν να καθορίσουν και την περαιτέρω προσβολή (Trematerra *et al.*, 1999; Trematerra 2009; Ukeh *et al.*, 2010; Trematerra *et al.*, 2013).

Αντίθετα, υπάρχουν δυσανάλογα λίγες μελέτες που επικεντρώνονται στην επίδραση των γεωργικών πρακτικών πριν τη συγκομιδή στην εμφάνιση επιβλαβών οργανισμών σε αποθηκευμένους σπόρους. Έχει γίνει προσπάθεια να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ προσβολής από το *S. zeamais* στην ανάπτυξη και στην απόδοση σε σπόρο φυτών αραβόσιτου ανάλογα με τη μέθοδο λίπανσης που έχει χορηγηθεί στην καλλιέργεια (Marsaro Junior *et al.*, 2007).

Οι περισσότερες μελέτες που αξιολογούν την συμπεριφορά των εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων σε εντομοκτόνες ενώσεις αναφέρονται κυρίως σε αιθέρια έλαια και άλλα παράγωγα φυτών (Fields *et al.*, 2001b; Hori, 2003; Licciardello *et al.*, 2013; Olivero-Verbel *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016), ενώ η επίδραση των συνθετικών εντομοκτόνων στη συμπεριφορά των εντόμων είναι λιγότερο μελετημένη (Willey, 1987; Velki *et al.* 2014; Sunderland and Cruickshank, 2016). Για παράδειγμα, ο Hori (2003) διεξήγαγε μια έρευνα σχετικά με τις αποκρίσεις συμπεριφοράς των ενηλίκων θηλυκών του είδους *L. serricornis* σε μια σειρά φυτικών αιθέριων ελαίων όπου επισήμανε το εξαιρετικά απωθητικό αποτέλεσμα αυτών. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρουσιασθεί για διάφορα αιθέρια έλαια όπως το αιθέριο έλαιο του *Artemisia annua* L. για την αντιμετώπιση του *T. castaneum* (Tripathi *et al.*, 2000) και το αιθέριο έλαιο του *Evodia rutaecarpa* εναντίον του *S. zeamais* και του *T. castaneum* (Liu and Ho, 1999).

Επιπλέον, η εντομοκτόνος αποτελεσματικότητα και η τοξικότητα της γης διατόμων και του *spinosad* σε έντομα αποθηκευμένων προϊόντων έχουν

προηγουμένως καλά τεκμηριωθεί, ενώ δεδομένα σχετικά με την επίδραση αυτών των ενώσεων στη συμπεριφορά των εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων είναι περιορισμένα. Σύμφωνα με δημοσιευμένη έρευνα, διεξήχθησαν εργαστηριακές βιοδοκιμές για να προσδιοριστεί η συμπεριφορά των ενηλίκων και των προνυμφών του *T. confusum* και των προνυμφών του *E. kuehniella* σε επιφάνειες κατεργασμένες με δύο εμπορικά σκευάσματα γης διατομών (Insecto, SilicoSec) και του spinosad, εφαρμοζόμενες κάθε μια ξεχωριστά ή σε συνδυασμούς. Γενικά, τα έντομα παρουσίασαν θετική προτίμηση στους σπόρους σίτου στους οποίους είχε εφαρμοσθεί γη διατομών σε σύγκριση σπόρους χωρίς γη διατομών. Είναι ενδιαφέρον ότι παρατηρήθηκε έντονη θετική προτίμηση και για το σκεύασμα spinosad (Athanassiou *et al.*, 2017).

Οι Turinek *et. al* (2017) πραγματοποίησαν έρευνα κατά την οποία συσχετίστηκαν: η θνησιμότητα, η παραγωγή απογόνων και προτίμηση κατανάλωσης του εντόμου *S. zeamais*, με την μεταχείριση που είχαν υποστεί φυτά και σπόροι σίτου (φυτά αραβόσιτου που προέρχονταν από ολοκληρωμένη διαχείριση, βιολογική καλλιέργεια, βιοδυναμική καλλιέργεια, μάρτυρας). Παρατηρήθηκε υψηλότερη θνησιμότητα στα δείγματα με σπόρους βιολογικής διαχείρισης σε σύγκριση με αυτά της ολοκληρωμένης μετά από 7 ημέρες. Η παραγωγή απογόνων η οποία καταγράφηκε 56 ημέρες αργότερα μετά την αφαίρεση των ακμαίων, καταγράφηκε υψηλότερη σε συνθήκες σχετικής υγρασίας 75%, σε σύγκριση με αυτή των 55%. Σε σχετική υγρασία 55% και 20°C η παραγωγή απογόνων ήταν 60,8% υψηλότερη κατά την έκθεση του *S. zeamais* σε σπόρους βιολογικής διαχείρισης. Τέλος, το σύστημα διαχείρισης της καλλιέργειας επηρέασε τα ποσοστά θνησιμότητας, τα οποία φαίνεται να ήταν υψηλότερα στα εναλλακτικά συστήματα σε σύγκριση με αυτά των συστημάτων ολοκληρωμένης διαχείρισης υπό άριστες συνθήκες (χαμηλή θερμοκρασία και σχετική υγρασία). Η παραγωγή απογόνων δεν επηρεάστηκε από το σιτάρι διαφορετικών συστημάτων παραγωγής. Καταληκτικά, η κατανόηση των γεωργικών διεργασιών, αλλά και των βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων που μεταβάλλουν τη μετά τη συγκομιδή προτίμηση κατανάλωσης των εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων, θα μπορούσαν να είναι χρήσιμη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών για τη βιομηχανία τροφίμων. Παρ' όλα αυτά κρίνονται απαραίτητες επερχόμενες μελέτες περεταίρω

διερεύνησης των αποδόσεων μετά τη συγκομιδή άλλων σπόρων από βιολογικά και συμβατικά συστήματα παραγωγής, καθώς και της ικανότητας των εντόμων να αξιολογούν τις διαφορές στα προϊόντα από διάφορα συστήματα παραγωγής.

1.7 Κυανοτοξίνες και έντομα

Οι αναφορές στη βιβλιογραφία για την επίδραση κυανοτοξινών στα έντομα είναι εξαιρετικά περιορισμένες. Αξίζει να αναφερθεί μία πρόσφατη έρευνα από τους Liarte *et al.* (2014), όπου προνύμφες του εφημεροπτέρου *Ecdyonurus angelieri* Thomas εκτέθηκαν σε δυο από τις κύριες μικροκυστίνες (MC-LR και MC-LW) διαλυμένες στο νερό, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν μπορεί να προκαλέσουν ιστολογική βλάβη στον οργανισμό όπως περιγράφεται για άλλα είδη. Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών (5 ppb) που εκτέθηκαν οι νύμφες του συγκεκριμένου εντόμου ήταν προσομοίωση των αντίστοιχων επιπέδων της υπό εξέταση λεκάνης του ποταμού Muga (Καταλονία, Ισπανία). Φάνηκε ότι οι προνύμφες του *E. angelieri* έδειξαν οξεία ευαισθησία στις συγκεκριμένες τοξίνες, γεγονός που τις καθιστά καλό υποψήφιο για την έγκαιρη ανίχνευση των μικροκυστινών σε ταμιευτήρες. Επιπλέον, μετά από την κατάλληλη προετοιμασία προκειμένου να πραγματοποιηθεί μορφολογική και ανοσοκυτταροχημική ανάλυση, παρατηρήθηκαν : ιστολογικές διαταραχές στο λιπώδη ιστό και στο επιθήλιο του τραχειακού συστήματος, ιδιαίτερα στα δείγματα που εκτέθηκαν στον LR τύπο μικροκυστίνης.

Επιπλέον, σύμφωνα με έρευνα που παρουσίασαν οι Singh *et. al* (2002), το κυανοβακτήριο *Microcystis aeruginosa* που σχηματίζει ανθίσεις σε υδάτινα οικοσυστήματα, και το *Scytonema sp.* που απομονώθηκε από τοπικό έδαφος με στέλεχος BT 23, φάνηκε ότι περιέχουν βιο-τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες με εντομοκτόνο αλλά και θανατηφόρο δράση τόσο έναντι της νύμφης κουνουπιών του γένους *Culex* και *Anopheles* όσο και των λεπιδοπτέρων *Pieris brassicae* και *Plutella xylostella*. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι στην έρευνα αυτή, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και χημική ανάλυση μιας τοξικής ουσίας από το κυανοβακτήριο *M. aeruginosa*, η οποία ταυτοποιήθηκε ως το ηπατοτοξικό επταπεπτίδιο microcystin-

LR, δηλαδή η MC-LR. Τα κυανοβακτηριακά συστατικά έδειξαν σημαντική δραστικότητα τόσο στις νύμφες των κουνουπιών όσο και των λεπιδοπτέρων, καθώς παρατηρήθηκε αυξημένη θνησιμότητα κατά τη βιοδοκιμή με εκχύλισμα χαμηλής συγκέντρωσης του *M. aeruginosa*, ενώ αντίστοιχη τιμή θνησιμότητας (μέχρι και 96%) παρατηρήθηκε κατά την βιοδοκιμή με την καθαρή τοξίνη υψηλής συγκέντρωσης ($40\mu\text{g mL}^{-1}$) από το *Scytonema sp.*

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Με βάση τις παραπάνω μελέτες διαφαίνεται η αναγκαιότητα για περαιτέρω έρευνα πάνω στις επιδράσεις των μικροκυστινών τόσο στις φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών και τους παράγοντες που τις επηρεάζουν όσο και στην θνησιμότητα και παραγωγή απογόνων των εντόμων. Η παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του νερού της λίμνης Κάρλας ως αρδευτικό, στην ανάπτυξη και τη φυσιολογία του αραβόσιτου, αλλά και στη θνησιμότητα και παραγωγή απογόνων των εντόμων αποθηκών, και στην προτίμηση σπόρων με ή χωρίς μικροκυστίνες. Επιπλέον, διερευνήθηκε η περιεκτικότητα τόσο των σπόρων αραβόσιτου όσο και των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν σε μικροκυστίνες.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Φυτά

3.1.1 Πειραματικές Συνθήκες

Το παρόν πείραμα διεξήχθη αρχικά σε συνθήκες θερμοκηπίου και αργότερα σε εξωτερικό χώρο του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στις 11/3/2017 σπόροι αραβόσιτου της ποικιλίας **NK Cisko** φυτεύτηκαν σε δύο πλαστικούς δίσκους σπορίων, όπου κάθε δίσκος αρδεύονταν με νερό βρύσης και με νερό από τη λίμνη Κάρλα αντίστοιχα. Ως υπόστρωμα του κάθε δίσκου σπορίων χρησιμοποιήθηκε τύρφη.



Εικόνα 4: Φυτά αραβόσιτου σε δίσκους σπορίων (αριστερά: φυτά που αρδεύονταν με νερό βρύσης και δεξιά: φυτά που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα).

Όταν τα αρτίβλαστα έφτασαν σε ένα ικανοποιητικό μέγεθος, τότε επιλέχθηκαν τυχαία 20 φυτά αραβόσιτου από τον δίσκο σπορίων που αρδεύονταν με νερό Βρύσης και 20 φυτά από τον δίσκο σπορίων που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα και μεταφυτεύτηκαν (30/3/2017) σε γλάστρες επιφάνειας: 254cm², οι οποίες συμπληρώθηκαν με έδαφος και περλίτη σε αναλογία 2:1. Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των φυτών αραβόσιτου, συλλέχθηκε από το Αγρόκτημα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Βελεστίνο) και κοσκινίστηκε με κόσκινο διαμέτρου πόρων 4mm, η ανάλυση του οποίου παρουσιάζεται στον ακόλουθο Πίνακα (Πίνακας 2).

Το νερό από τη λίμνη Κάρλα με το οποίο αρδεύονταν τα φυτά κατά τη διάρκεια του πειράματος συλλέχθηκε άπαξ και αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό θάλαμο με χαμηλές θερμοκρασίες. Η συχνότητα και η ποσότητα του ποτίσματος διακυμάνθηκε ανάλογα με τις απαιτήσεις που είχαν τα υπό μελέτη φυτά. Όσον αφορά τη συχνότητα, αρχικά κυμάνθηκε ανά 3 ημέρες σε ποσότητες των 200 mL ανά φυτό ενώ στο τέλος η διαδικασία του ποτίσματος πραγματοποιούνταν καθημερινά φτάνοντας μέχρι και 600 mL. Η συνολική ποσότητα νερού που χορηγήθηκε στα υπό μελέτη φυτά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος αυτού, ανέρχεται στα 15 L ανά φυτό, εξίσου και για τις δυο μεταχειρίσεις (Βρύση, Κάρλα). Επιπλέον, θα πρέπει να επισημανθεί ότι κάθε 15 μέρες πραγματοποιούνταν αλλαγή της θέσης των φυτών (rotation) για την αποφυγή των επιδράσεων της μικροθέσης.



Εικόνα 5: Φυτά αραβόσιτου των δυο μεταχειρίσεων (αριστερά: φυτά που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα και δεξιά: φυτά που αρδεύονταν με νερό βρύσης) μετά τη μεταφύτευση σε γλάστρες.



Εικόνα 6: Πότισμα φυτών αραβόσιτου με ποτήρι ζέσεως.

3.1.2 Εδαφολογική ανάλυση και λίπανση

Επιπλέον, σύμφωνα με την εδαφολογική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, ακολούθησε η απαραίτητη βασική και επιφανειακή λίπανση των φυτών αραβόσιτου ώστε να καλυφθούν οι ανάγκες του φυτού στα απαραίτητα μακροστοιχεία. Για τη βασική λίπανση (25/4/17), χρησιμοποιήθηκε λίπασμα 15-15-15 και έπειτα από υπολογισμούς χορηγήθηκε η ποσότητα των 2,2 g ανά γλάστρα ώστε να ικανοποιηθεί η άριστη ποσότητα σε ανάγκες N του αραβόσιτου (4g ανά γλάστρα). Ενώ για την επιφανειακή λίπανση (8/5/17), χρησιμοποιήθηκε το λίπασμα 34,5-0-0 και έπειτα από τους αντίστοιχους υπολογισμούς, χορηγήθηκε η ποσότητα του 1g ανά γλάστρα. Και τα δυο λιπάσματα χορηγήθηκαν στα φυτά αραβόσιτου έπειτα από διάλυσή τους σε 250 mL νερού.

Πίνακας 2: Εδαφολογική ανάλυση εδάφους που χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πείραμα.

ΕΔΑΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	
ΚΟΚΟΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ	Πηλώδες (L)
PH (1:2 wt/vol σε νερό)	7,78
ΑΝΘΡΑΚΑ ΑΛΑΤΑ (%) Bernard method	10,25
ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΟΥΣΙΑ (%) Walkey-Black Method	2,886
I.A.K. (meq/100 g εδάφους)	15,83
ΦΩΣΦΟΡΟΣ_κατα Olsen (mg/Kg)	23,29
ΚΑΛΙΟ εκχυλίσμο σε οξικό αμμώνιο (mg/Kg)	302
ΝΑΤΡΙΟ εκχυλίσμο σε οξικό αμμώνιο (mg/Kg)	66
ΑΖΩΤΟ (%) κατά Kjeldahl	0,126
Μαγνήσιο εκχυλίσμο σε οξικό αμμώνιο (mg/Kg)	465
Ασβέστιο εκχυλίσμο σε οξικό αμμώνιο (mg/Kg)	8390
Σίδηρος εκχυλίσμος σε DTPA (mg/Kg)	5,56
Ψευδάργυρος εκχυλίσμος σε DTPA (mg/Kg)	1,198
Μαγγάνιο εκχυλίσμος σε DTPA (mg/Kg)	15,38
Χαλκός εκχυλίσμος σε DTPA (mg/Kg)	2,306
Ηλεκτρική αγωγιμότητα (μS/cm)	257

3.1.3 Ενδιάμεσες και Τελικές μετρήσεις

Καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και μέχρι την τελική συγκομιδή, πραγματοποιούνταν μετρήσεις μορφολογικών παραμέτρων όπως το ύψος των φυτών και ο αριθμός των φύλων των φυτών σε κάθε μεταχείριση. Ενώ παράλληλα πραγματοποιούνταν μετρήσεις υπολογισμού της συγκέντρωσης των ολικών χλωροφυλλών μέσω του δείκτη *spad* αλλά και μετρήσεις φθορισμού της χλωροφύλλης. Επιπλέον, κατά τη συγκομιδή (25/6/17) όσον αφορά το υπέργειο τμήμα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις νωπού και ξηρού βάρους φύλλων, πάχος και μήκος σπάδικα, αριθμό σπόρων σπάδικα αλλά και βάρους χιλίων σπόρων, και για το υπόγειο τμήμα, ξηρό βάρος ριζών. Οι ρίζες καθαρίστηκαν με νερό ώστε να απομακρυνθεί το έδαφος και ακολούθησε 48ωρη ξήρανση σε ξηραντήριο στους 80°C του υπέργειου και υπόγειου μέρους του φυτού, μετά την οποία μετρήθηκε το ξηρό βάρος των φύλλων, της ρίζας και των σπόρων αφού απομονώθηκαν από τον σπάδικα. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) παρουσιάζονται χρονικά οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν.



Εικόνα 7: Μετρήσεις φθορισμού χλωροφύλλης σε φυτά αραβόσιτου.

Πίνακας 3: Μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο στάδιο ανάπτυξης των φυτών αλλά και κατά την συγκομιδή.

ΤΥΠΟΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ	ΧΡΟΝΙΚΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ		
	1^ο ΠΑΚΕΤΟ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ 26-27/4/2017	2^ο ΠΑΚΕΤΟ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ 16-17/5/2017	3^ο ΠΑΚΕΤΟ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ 24-26/6/2017
ΥΨΟΣ ΦΥΤΟΥ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ	✓	✓	✓
SPAD	✓	✓	✓
ΦΘΟΡΙΣΜΟΣ	✓	✓	
ΝΩΠΟ ΚΑΙ ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΛΛΩΝ			✓
ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΡΙΖΩΝ			✓
ΠΑΧΟΣ ΚΑΙ ΜΗΚΟΣ ΣΠΑΔΙΚΑ			✓
ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΠΟΡΩΝ ΚΑΙ ΒΑΡΟΣ ΧΙΛΙΩΝ ΣΠΟΡΩΝ			✓

3.1.4 Προσδιορισμός χλωροφυλλών

Η συγκέντρωση των χλωροφυλλών προσδιορίστηκε εμμέσως, μη καταστροφικά, με φορητό χλωροφυλλόμετρο (SPAD-502, Minolta Co Ltd., Japan). Η μέτρηση με το συγκεκριμένο όργανο βασίζεται στη σύγκριση της διαπερατότητας του φύλλου σε δύο μήκη κύματος, στα 650 nm όπου απορροφά η χλωροφύλλη και στα 940 nm, όπου δεν απορροφά κανένα συστατικό του φύλλου. Οι προκύπτουσες τιμές είναι ανάλογες της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης στα φύλλα. Καθώς το χλωροφυλλόμετρο δίνει σχετικές τιμές, είναι αναγκαία η βαθμονόμηση του με τις πραγματικές συγκεντρώσεις χλωροφυλλών που προκύπτουν από την κλασσική φασματοφωτομετρική μέθοδο (Lichtenthaler and Wellburn, 1983). Η προκύπτουσα πρότυπη καμπύλη (τιμές SPAD έναντι πραγματικών συγκεντρώσεων χλωροφυλλών) είναι μοναδική για κάθε φυτικό είδος και το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στην πολυπλοκότητα του μονοπατιού διέλευσης του φωτός μέσα στο φύλλο (Manetas *et al.*, 1998).

Προκειμένου να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη, η συγκέντρωση των φωτοσυνθετικών χρωστικών μετρήθηκε σε φύλλα καλαμποκιού από σημεία στα οποία καταγράφηκε και η τιμή SPAD. Για την επακόλουθη εκχύλιση, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε γουδί πορσελάνης μαζί με μικρή ποσότητα (0,5g) καθαρής άμμου και ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3 0,1g). Τα φύλλα εκχυλίστηκαν με 5ml ακετόνης 80%, τα οποία προστέθηκαν σταδιακά. Τα εκχυλίσματα μεταγγίστηκαν σε σωλήνες φυγόκεντρου και τα δείγματα φυγοκεντήθηκαν για 10min στα 2500g (4000 στροφές ανά λεπτό). Τα διαυγή πράσινα υπερκείμενα μεταγγίστηκαν σε ογκομετρικούς σωλήνες και καταγράφηκαν οι όγκοι τους. Τα υπερκείμενα φωτομετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης στα 470, 646, 663 και 720nm και καταγράφηκαν οι απορροφήσεις αυτών αφού πρώτα αραιώθηκαν 3 φορές. Υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις σε χλωροφύλλη a και χλωροφύλλη b σε $\mu\text{g/ml}$ διαλύματος με βάση τις ακόλουθες εξισώσεις (Lichtenthaler and Wellburn, 1983):

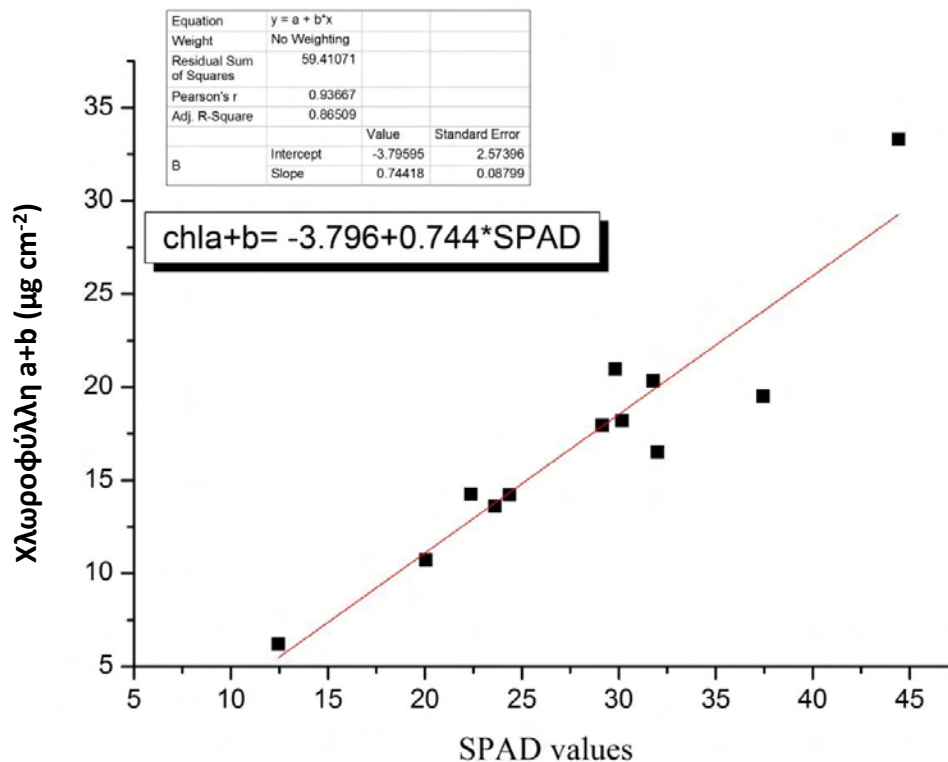
$$\text{Ca} = 12.21A_{663} - 2.81A_{646}$$

$$\text{Cb} = 20.13A_{646} - 5.03A_{663}$$

Όπου,

Ca, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης a, $\mu\text{g/ml}$ διαλύματος

Cb, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης b, $\mu\text{g/ml}$ διαλύματος



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη μετατροπής των τιμών SPAD σε συγκέντρωση ολικών χλωροφυλλών a+b ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

3.1.5 Φθορισμός Χλωροφύλλης

Στα φυτά αραβόσιτου πραγματοποιήθηκαν επίσης, συμπληρωματικές μετρήσεις για τον προσδιορισμό ορισμένων φωτοσυνθετικών παραμέτρων με το φθορισμόμετρο συνεχούς διέγερσης Handy-PEA (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, Norfolk, UK).

Το συγκεκριμένο όργανο αποτελείται από μια κεντρική μονάδα και μια κεφαλή που φέρει τρεις λαμπτήρες τύπου LED. Η κεφαλή προσαρμόζεται απόλυτα στους ειδικούς υποδοχείς (leaf clips), οι οποίοι διαθέτουν ειδικό κλείστρο, που επιτρέπει ή αποκλείει τη διέλευση φωτισμού (Εικόνα 8). Η μέγιστη ένταση του

φωτός διέγερσης που μπορεί να εκπεμφθεί από τους λαμπτήρες φτάνει τα 3000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, με μέγιστο εκπομπής στα 650 nm. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός του δείγματος ανιχνεύεται στα 700 nm από έναν ειδικό ανιχνευτή που εντοπίζεται στο κέντρο της κεφαλής. Μήκη κύματος μικρότερα των 700 nm (ανακλώμενο φως) δεν επηρεάζουν την ανίχνευση, καθώς παρεμποδίζονται από ειδικό φίλτρο. Η αρχή λειτουργίας του οργάνου στηρίζεται στην ιδιότητα των λαμπτήρων LED να εκπέμπουν σταθερή ένταση φωτός περιορισμένου φασματικού εύρους. Αντιστοίχως, ο εκπεμπόμενος φθορισμός εντοπίζεται πάντα σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από αυτά της πηγής. Συνεπώς, η ανίχνευση του φθορισμού γίνεται βάσει του μήκους κύματος και όχι της συχνότητας εκπομπής του. Απαραίτητη προϋπόθεση αυτής της αρχής λειτουργίας είναι ο φωτοσυνθετικός ιστός να μη δέχεται ακτινοβολία άλλης πηγής. Τα φθορισμόμετρα συνεχούς διέγερσης παρέχουν τη δυνατότητα μέτρησης της ταχείας φάσης επαγωγής του φθορισμού της χλωροφύλλης σε προσκοτεινιασμένους ιστούς. Οι πληροφορίες που προκύπτουν από την ανάλυση της ταχείας φάσης του φθορισμού απαντούν σε ερωτήματα για τις επιμέρους αποδόσεις και ροές ενέργειας κατά μήκος της αλυσίδας ροής ηλεκτρονίων των φωτεινών αντιδράσεων.



Εικόνα 8: Φθορισμόμετρο συνεχούς διέγερσης Handy-PEA. Αποτελείται από την κεντρική μονάδα και την κεφαλή με τους λαμπτήρες τύπου LED. Η κεφαλή προσαρμόζεται στους ειδικούς υποδοχείς (leaf clips) με το κλείστρο.

3.1.5 Φυλλοδιαγνωστική

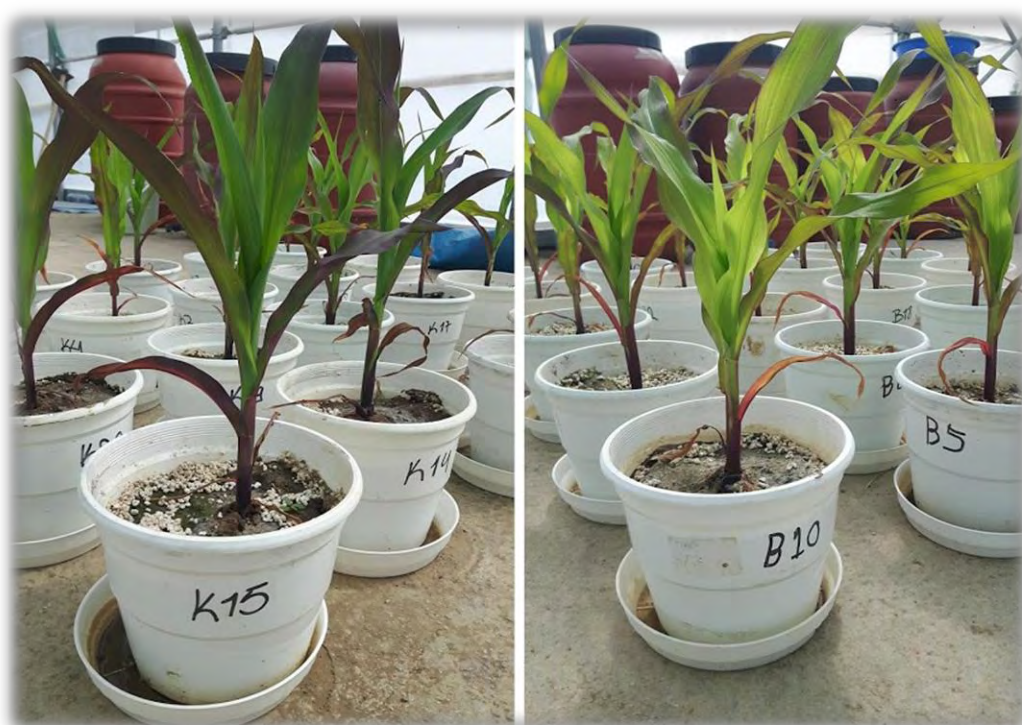
Επιπλέον, σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι κατά το στάδιο ανάπτυξης των φυτών και πιο συγκεκριμένα κατά τον 2^ο μήνα του πειράματος τα φυτά της μεταχείρισης με νερό από τη λίμνη Κάρλα, παρουσίασαν συμπτώματα έντονου στρες, τα οποία αρχικά εκδηλώθηκαν με μια σκούρα κόκκινη χρώση των φύλλων του αραβόσιτου, ενώ με την πάροδο του χρόνου και την ανάπτυξη των φυτών παρουσιάστηκε έντονη συστροφή των φύλλων και εκτεταμένη χλώρωση στην παράλληλη νεύρωση αρχικά στα νεαρά και έπειτα στα γηραιότερα φύλλα των φυτών (Εικόνες 9,10). Προκειμένου να διερευνηθεί εκτενέστερα η συγκεκριμένη συμπτωματολογία, πάρθηκαν δείγματα νεαρών φύλλων από τυχαία φυτά και των δυο μεταχειρίσεων ώστε να πραγματοποιηθεί φυλλοδιαγνωστική ανάλυση. Η συγκεκριμένη ανάλυση διεξήχθη στο εργαστήριο Εδαφολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, όπου προσδιορίστηκαν τα κατιόντα Na, K, Ca, Mg και το ανιόν Fe. Τα συγκεκριμένα στοιχεία προσδιορίστηκαν επίσης στο νερό βρύσης αλλά και στο νερό της λίμνης Κάρλας.

Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 6 φυτά από κάθε μεταχείριση από τα οποία επιλέχτηκε ένα φύλλο ούτε πολύ νεαρό ούτε πολύ γηραιό. Οι φυτικοί ιστοί τοποθετήθηκαν σε χάρτινες σακούλες και έπειτα σε φούρνο στους 70°C μέχρι τη μη περαιτέρω απώλεια βάρους, και κονιορτοποιήθηκαν σε μύλο άλεσης. Το κονιορτοποιημένο δείγμα, τοποθετήθηκε σε πλαστικές σακούλες και αποθηκεύτηκε για τις εκχυλίσσεις. Η διαδικασία αποτέφρωσης του φυτικού ιστού σκοπό έχει την καταστροφή της οργανικής ουσίας των φυτικών ιστών. Για την καύση χρειαστήκαμε 0,5 g από τον κονιορτοποιημένο φυτικό ιστό ο οποίος τοποθετήθηκε σε χωνευτήρια πορσελάνης για να καεί σε ηλεκτρικό φούρνο σε θερμοκρασία 500°C για 24 ώρες. Όταν κρύωσαν οι κάψες αποτέφρωσης, έγινε η παραλαβή της τέφρας του φυτικού ιστού με 20 mL 20% HCl και πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της διήθησης από διηθητικό χαρτί σε ογκομετρικές φιάλες των 50 mL. Το εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των ιχνοστοιχείων. Κατόπιν τα εκχυλίσματα αραιώθηκαν κατά 100 φορές για τη μέτρηση των μακροστοιχείων Ca, Mg κατά 20 φορές για τη μέτρηση

των K, Na ενώ το «πυκνό» εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των ιχνοστοιχείων όπως Fe. Το K και το Na μετρήθηκαν στο φλογοφωτόμετρο τύπου Sherwood Model 410 ενώ τα υπόλοιπα στοιχεία στην ατομική απορρόφηση τύπου Perkin Elmer 3300.

Όσον αφορά τη μέτρηση των μακροστοιχείων, οι τύποι υπολογισμού των συγκεντρώσεων είναι οι εξής: $M \text{ (mg kg}^{-1} \text{ φυτού)} = (A/B) * (\text{mL ογκομετρικής φιάλης παραλαβής εκχυλίσματος}) * (\text{τις φορές αράιωσης του εκχυλίσματος})$, όπου M είναι κατά περίπτωση το Ca, το Mg και το K, Na, $A = \text{mg L}^{-1}$ μετάλλου στο εκχύλισμα (αυτό που μετράμε στην ατομική απορρόφηση) και $B =$ βάρος φυτικού υλικού που αποτεφρώσαμε.

Ενώ όσον αφορά την μέτρηση του ιχνοστοιχείου (Fe), ο τύπος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων είναι ο εξής: $M = (\text{mL ογκομετρικής φιάλης διήθησης}) * (A/B)$, όπου M είναι ο Fe, $A = \text{mg L}^{-1}$ μετάλλου στο εκχύλισμα (αυτό που μετράμε στην ατομική απορρόφηση) και $B =$ βάρος φυτικού υλικού που αποτεφρώσαμε.



Εικόνα 9: Σκούρα κόκκινη χρώση στα φύλλα των φυτών που αρδεύονται με νερό από τη λίμνη Κάρλα (αριστερά) σε παράθεση με τα φυτά που αρδεύονται με νερό από τη βρύση (δεξιά)



Εικόνα 10: Εμφάνιση εκτεταμένης χλώρωσης σε φυτά που αρδεύονταν με νερό από λίμνη Κάρλα.

Λόγω της εκτεταμένης χλώρωσης οι καρποί των φυτών αραβόσιτου δεν ολοκλήρωσαν την ωρίμανσή τους. Το γεγονός αυτό, οδήγησε στη χρήση καρπών αραβόσιτου από αγροτεμάχιο έξω από το χωριό Ριζόμυλο (Μαγνησίας) (με συντεταγμένες: $39^{\circ}26.222'$, $022^{\circ}44.918'$) στο οποίο το 2015 ανιχνεύτηκαν τόσο στο νερό με το οποίο αρδεύονταν όσο και στους καρπούς υψηλά επίπεδα μικροκυστινών, ώστε να ολοκληρωθεί το δεύτερο μέρος του συγκεκριμένου πειράματος.



Εικόνα 11: Αγρατεμάχιο με συντεταγμένες 39° 26.222', 022° 44.918' από το οποίο λήφθηκαν σπόροι αραβόσιτου.

3.2 Έντομα

Τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το *Prostephanus truncatus* και το *Sitophilus zeamais*. Το *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae) ή αλλιώς σκαθάρι του αραβόσιτου όσον αφορά τη μορφολογία του: Το τέλειο έντομο έχει μήκος που κυμαίνεται στα 3-4 mm, φέρει οπίσθιο ζεύγος μεμβρανοειδών πτερύγων, χάρη στις οποίες μπορεί και πετάει, στρογγυλά ή ακανόνιστου σχήματος κοιλώματα στο θώρακα και τέσσερις κοκκινωπές κηλίδες στα έλυτρα, οι οποίες είναι ελαφρά κοκκινωπές, έως κιτρινωπές (Lyon, 1991; Jacobs and Calvin, 2001; Farrell, 2009; CABI, 2010; Anonymous, 2013). Μοιάζει πολύ με το *S. oryzae* και ο ασφαλής διαχωρισμός των ειδών βασίζεται στα genitalia. Ενώ όσον αφορά τη βιολογία του: Τα ακμαία ζουν κατά μέσο όρο περίπου έξι έως επτά εβδομάδες (Farrell, 2009). Ο πλήρης βιολογικός του κύκλος σε ιδανικές συνθήκες, με θερμοκρασία 27°C και σχετική υγρασία 69%, διαρκεί κατά μέσο όρο 36 ημέρες, ενώ

ξεπερνάει τις 110 ημέρες σε αντίξοες συνθήκες (Farrell, 2009; CABI 2010). Κάθε θηλυκό, στη διάρκεια της ζωής του, εναποθέτει έως και 150 ωά, το 50% των οποίων παράγεται κατά τις πρώτες 4 με 5 εβδομάδες (CABI, 2010). Τα θηλυκά συνήθως εναποθέτουν ένα ωό ανά σπόρο, υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου μπορεί να εναποθέσουν και περισσότερα. Σπάνια όμως αναπτύσσονται πάνω από μία προνύμφες σε ένα μόνο σπόρο, εξαιτίας του κανιβαλισμού που παρατηρείται (οι μεγαλύτερες προνύμφες τρώνε τις μικρότερες) (Longstaff, 1981). Ο ημερήσιος ρυθμός γέννησης για τα θηλυκά είναι 7 ωά την ημέρα και επιτυγχάνεται ιδανικά σε θερμοκρασία 30°C και σχετική υγρασία 75%. Το κατώτερο όριο για την ανάπτυξη από το ωό στο ακμαίο, σε σχετική υγρασία 75%, είναι 15,6°C και το ανώτατο όριο 32,5°C (Farrell, 2009).

Το *S. zeamais* μπορεί να αναπτυχθεί σε μια σειρά από αποθηκευμένα δημητριακά. Συνήθως συνδέεται με το καλαμπόκι και το ρύζι στα τροπικά κλίματα και σε μικρότερο βαθμό με άλλα ακατέργαστα ή κατεργασμένα σιτηρά, όπως το σιτάρι, η βρώμη, το κριθάρι, το σόργο και η σίκαλη. Όπως και στα συγγενή του είδη, δεν υπάρχει καμία εξωγενής ένδειξη της προσβολής από τις προνύμφες για περίπου ένα μήνα, μέχρις ότου αυτές νυμφωθούν και μεταμορφωθούν στα ακμαία. Επιπλέον, έχει βρεθεί να προσβάλλει ακόμα και φρούτα, όπως τα μήλα, κατά την αποθήκευση. Λόγω της ικανότητας του να πετά προσβάλλει και φυτά στον αγρό, κυρίως καλαμπόκι, όπου το ποσοστό υγρασίας του μπορεί να υπερβαίνει το 20% (Farrell, 2009).



Εικόνα 12: Ακμαίο *S. zeamais*

Το *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera, Bostrychidae) ως ακμαίο έχει μήκος 2,5 με 3 mm, με σχήμα κυλινδρικό και χρώμα καστανό. Η κεφαλή καλύπτεται από τον θώρακα, ο οποίος φέρει χαρακτηριστικά εξογκώματα. Τα έλυτρα φέρουν ευκρινείς κατά μήκος γραμμές από μικρά κοιλώματα. Τέλος, φέρει ισχυρά στοματικά μόρια μασητικού τύπου.

Βιολογία: Η ιδανική θερμοκρασία για ανάπτυξη στον αραβόσιτο είναι οι 32°C, στην οποία ο βιολογικός του κύκλος διαρκεί 24-25 ημέρες (Bell and Watters, 1982). Το έντομο μπορεί να ολοκληρώσει τον βιολογικό του κύκλο σε θερμοκρασίες μεταξύ 12°C και 40°C και σχετική υγρασία 30% με 90% με βέλτιστες αυτές των 32°C και 70-80% σχετική υγρασία αντίστοιχα. Τα θηλυκά άτομα, μετά την σύζευξη εναποθέτουν τα αυγά σε ομάδες των 20 εντός των στοών που δημιουργούν στους σπόρους του αραβοσίτου καλύπτοντας με λεπτή στρώση σκόνης (Howard, 1982 και 1983).

Διασπορά: Για πολλά χρόνια το *P. truncatus* αποτελούσε εχθρό των αποθηκευμένων σπόρων καλαμποκιού στο Μεξικό και στην Κεντρική Αμερική (Lesne, 1897; Chittenden, 1911). Σύμφωνα με Βρετανούς εντομολόγους έπειτα από έρευνες σχετικά με την βιολογία του *P. truncatus*, κατέληξαν στο γεγονός ότι οι κλιματολογικές συνθήκες και ο ανταγωνισμός από άλλους εχθρούς αποθηκευμένων προϊόντων ήταν απίθανο να αποτρέψουν την περαιτέρω διασπορά σε τροπικές χώρες (Shives, 1979; Howard, 1983). Αυτό επιβεβαιώθηκε, με την εκρηκτική διασπορά του είδους στην Αφρική το 1981 (Golob and Hodges, 1982). Από την 'εισαγωγή' του στην Αφρική, μια πληθώρα ερευνών παράχθηκε από διάφορες ερευνητικές ομάδες ιδιαίτερα από την Ευρώπη εστιάζοντας τόσο στην αντιμετώπισή του όσο και στη μελέτη της βιολογίας του, της οικολογίας του αλλά και της φυτοϋγειονομικής σημασίας του (Farrell and Schulten, 2002). Εξετάστηκε λεπτομερώς η προσαρμογή του *P. truncatus* σε βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες ώστε να μελετηθούν οι πιθανότητες για περεταίρω διασπορά και σε άλλες περιοχές (Boxall, 2002; Farrell and Schulten, 2002).

Προσβολή: Το συγκεκριμένο έντομο μπορεί να προσβάλλει και τους αποθηκευμένους σπόρους καλαμποκιού (Delgado and Hernandez Luna, 1951; Ramirez Genel, 1960b; Giles and Leon, 1975; Hodges *et al.*, 1983a) αλλά και την

καλλιέργεια αραβόσιτου στον αγρό, όταν το φυτό βρίσκεται στο στάδιο ξήρανσης αλλά διαθέτει ακόμα υγρασία 40-50% (Giles, 1975). Το ενδοσπέρμιο από μόνο του αποτελεί επαρκή διατροφή για το είδος. Η ευαισθησία των σπόρων του αραβόσιτου στο *P. truncatus* παρουσιάζει διαφορές από ποικιλία σε ποικιλία (Bell and Watters, 1982; Ramirez Martinez and Silver, 1983; Howard, 1983 και 1984). Οι σκληρότεροι, φλοιώδεις σπόροι 'υποφέρουν' λιγότερο από τις βλάβες που προκαλεί το συγκεκριμένο είδος. Ενώ σύμφωνα με τους Hodges *et al.* (1986) τα ενήλικα αυτού του είδους είναι μακρόβια και μπορούν να μολύνουν υγιείς πυρήνες με μεγάλη ευκολία, ενώ οι προνύμφες τρέφονται με το εσωτερικό τμήμα του πυρήνα και έχουν τη δυνατότητα να καταστρέψουν τον πυρήνα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, όταν οι συνθήκες που επικρατούν είναι κατάλληλες για την ανάπτυξή τους.



Εικόνα 13: Ακμαίο *P. truncatus*

Τα συγκεκριμένα έντομα ελήφθησαν από εκτροφές στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι εκτροφές των *P. truncatus* και *P. truncatus* έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία 25 °C και σχετική υγρασία (ΣΥ) 55 – 65 % σε συνεχές σκότος. Τα ενήλικα συλλέχθηκαν με κοσκίνισμα (κόσκινο 3mm) ώστε να διαχωριστούν από τα υπόλοιπα στάδια και από τους καρπούς του αραβόσιτου. Τα ακμαία παρέμειναν στο κόσκινο και εύκολα συλλέχθηκαν για τον πειραματισμό.

3.2.1 Βιοδοκιμές

Πρώτη Σειρά Βιοδοκιμών: Επίδραση του νερού της λίμνης Κάρλας στα είδη: *P.truncatus* και *S. zeamais* σε σπόρους αραβόσιτου.

Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι αραβόσιτου που αρδεύονταν με νερό βρύσης και σπόροι που συλλέχθηκαν από το αγροτεμάχιο στο χωριό Ριζόμυλος, στο οποίο ανιχνεύτηκαν αυξημένα ποσοστά κυανοτοξινών. Επιπλέον, προστέθηκαν σπόροι αραβόσιτου που διέθετε το εργαστήριο Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το οποίο χρησίμευσε ως αρνητικός έλεγχος. Πειραματικές μονάδες για τις δοκιμές αποτέλεσαν τα πλαστικά κυλινδρικά φιαλίδια (διαμέτρου 3 cm, ύψους 8 cm). Το άνω ένα τέταρτο του εσωτερικού μέρους του εσωτερικού κάθε φιαλιδίου καλύπτονταν από το Fluon (Northern Products, Woonsocket, USA) για την αποφυγή διαφυγής των εντόμων. Κάθε φιαλίδιο περιείχε 20 g σπόρων αραβόσιτου και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 20 ενήλικα άτομα σε κάθε φιαλίδιο, με ξεχωριστά φιαλίδια για κάθε είδος. Οι ποσότητες όλων των σπόρων διατηρήθηκαν στους 26 °C και σε ΣΥ 55%. Η θνησιμότητα των εκτεθειμένων ατόμων υπολογίστηκε μετά από 1, 7 και 14 ημέρες για όλα τα είδη των εντόμων. Μετά τη λήξη της διαδικασίας αυτής, τα έντομα παρέμειναν μέσα στα φιαλίδια στις ίδιες συνθήκες για 65 ημέρες προκειμένου να καταγραφεί η παραγωγή απογόνων.

Η ίδια διαδικασία (επαναλήψεις δυο φιαλιδίων) επαναλήφθηκε τέσσερις φορές με την παρασκευή δειγμάτων διαφορετικών σπόρων που δεν έχουν υποστεί κατεργασία κάθε φορά (2 x 2 φιαλίδια για κάθε μεταχείριση, συνολικά = 4 επαναλήψεις).



Εικόνα 14: Συλλογή ακμαίων *P. truncatus* και *S. zeamais* και τοποθέτηση σε φιαλίδια μαζί με σπόρους αραβόσιτου.

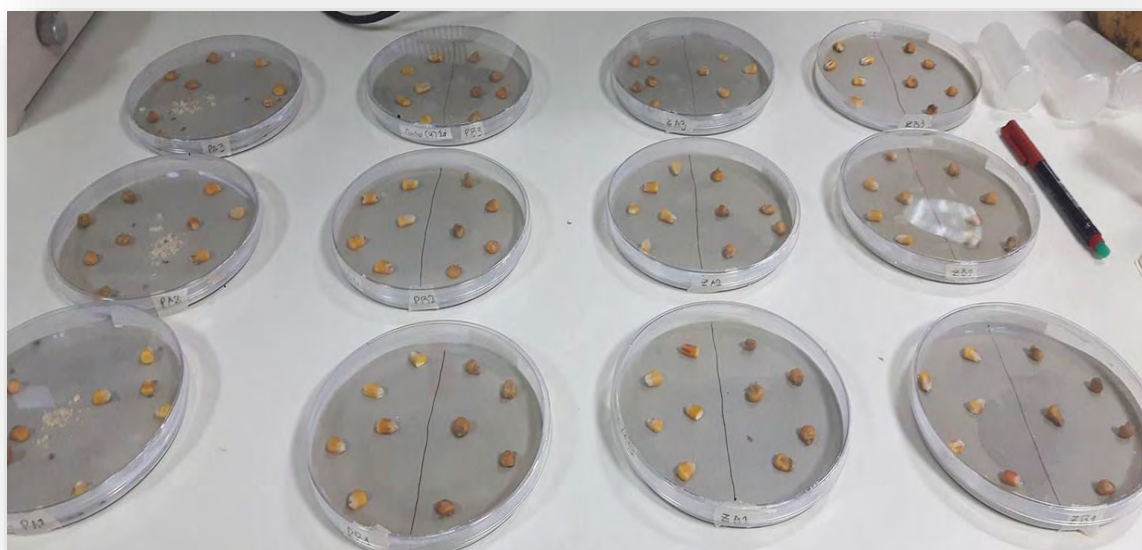
Δεύτερη σειρά Βιοδοκιμών: Εκτίμηση της προτίμηση των *P. truncatus* και *S. zeamais* στην κατανάλωση σπόρων αραβόσιτου ανάμεσα σε αυτούς που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα και σε αυτούς του Εργαστηρίου Εντομολογίας του Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (αρνητικός έλεγχος).

Χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα τρυβλία εμβαδού 156cm², διαμέτρου 14,1cm και ύψους 1,7cm τα οποία διέθεταν ως επιφάνεια, τσιμέντο.



Εικόνα 15: Γυάλινο τρυβλίο με σπόρους αραβόσιτου του Εργαστηρίου Εντομολογίας αριστερά και σπόρους αραβόσιτου που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα

Για τη δημιουργία τσιμέντου ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Χρησιμοποιήθηκε τσιμέντο Rockite (Hartline Products Co. Inc., Cleveland, OH, USA) σε αναλογία 1 προς 2 με νερό. Για την δημιουργία 1kg τσιμέντου αναμείχθηκαν 500gr σκόνης τσιμέντου και 250ml H₂O. Το μείγμα τοποθετήθηκε σε τρυβλία ώστε να δημιουργηθεί η επιθυμητή επιφάνεια, αφήνοντάς το κάποιες ώρες να στεγνώσει, σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 16: Τρυβλία με σπόρους αριστερά του Εργαστηρίου Εντομολογίας και δεξιά σπόροι που αρδεύονταν με νερό Κάρλας.

Σε αυτή τη βιοδοκιμή έλαβαν χώρα δύο επαναλήψεις με τρεις υποεπαναλήψεις (2 X 3) για κάθε είδος εντόμου. Αφού έγινε η επιλογή των ακμαίων από τις εκτροφές του εργαστηρίου, σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν πιο πάνω, τοποθετήθηκαν 5 σπόροι που αρδεύτηκαν με νερό από τη λίμνη Κάρλα από τη μια πλευρά του τρυβλίου και 5 σπόροι καλαμποκιού του εργαστηρίου Εντομολογίας, οι οποίοι διαχωρίστηκαν με μια γραμμή. Έπειτα, τοποθετήθηκαν 20 ενήλικα άτομα σε κάθε τρυβλίο και καταμετρούνταν ανά 5 λεπτά στη διάρκεια 1 ώρας ο αριθμός των ατόμων που βρίσκονταν σε κάθε πλευρά.

3.3 Εκχύλιση μικροκυστινών

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την εκχύλιση των μικροκυστινών τόσο από το νερό από τη λίμνη Κάρλα όσο και από τους σπόρους αραβόσιτου είναι μια τροποποιημένη μέθοδος η οποία βασίστηκε στη μέθοδο των Sipiä *et al.*, (2002). Πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση κάθε δείγματος με τη βοήθεια αυτόματου ομογενοποιητή (IKA T18 basic, ULTRA TURRAX). Οι μικροκυστίνες που περιείχονταν στο ομογενοποιημένο υλικό εκχυλίστηκαν τρεις φορές με μεθανόλη 100% σύμφωνα με τους Magalhães *et al.*, (2001). Ακολούθησε ομογενοποίηση με ανάδευση για 1 h. Το εναιώρημα τοποθετήθηκε σε κατεργασία με υπερήχους (Vibra Cell Sonicator, Sonics and Material Inc.) για 15 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στις 1300 rpm για 15 λεπτά (Sipiä *et al.*, 2002). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και η παραπάνω διαδικασία: προσθήκη μεθανόλης–ανάδευση–κατεργασία με υπερήχους– φυγοκέντρωση– συλλογή του υπερκειμένου επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύθηκε στους 4 °C για 12 ώρες σύμφωνα με τους Sipiä *et al.*, (2002). Ποσότητα ίση με 5 ml του υπερκειμένου τοποθετήθηκε σε ρεύμα αζώτου προκειμένου να εξατμιστεί πλήρως η μεθανόλη (Metcalf *et al.*, 2000). Το προσυγκεντρωμένο δείγμα επαναδιαλύθηκε σε ελάχιστο όγκο μεθανόλης 100%. Ακολούθησε αραίωση του δείγματος με απεσταγμένο νερό έτσι ώστε να μειωθεί ο όγκος της μεθανόλης στο 2% (Carmichael & An, 1999). Το τελικό δείγμα διηθήθηκε μέσω μεμβρανώδους ηθμού (μέγεθος πόρων: 0.45 μm, διάμετρος: 4mm) (Sipiä *et al.*, 2002). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροκυστινών που περιέχονται στο παραπάνω διήθημα, πραγματοποιήθηκε μέσω της ενζυμοσυνδεόμενης ανοσοπροσροφητικής τεχνικής (ELISA).

3.3.1 Ενζυμοσυνδεόμενη Ανοσοπροσροφητική Τεχνική

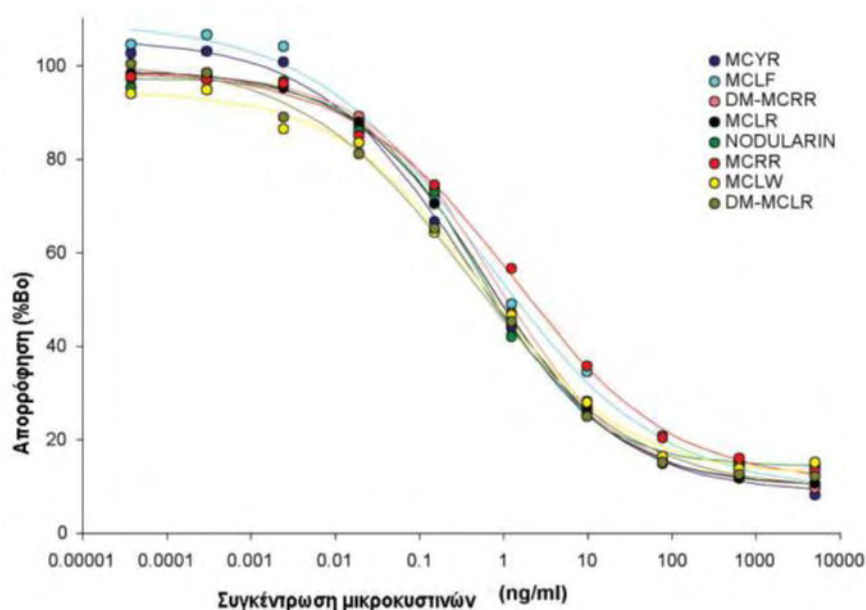
Η ενζυμοσυνδεόμενη ανοσοπροσροφητική τεχνική, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με το σύστημα ABRAXIS-Microcystin ELISA kit (520011, USA)(Εικόνα 17). Η κατασκευή και η χρήση

του παραπάνω συστήματος βασίζεται σε μια νέα τεχνική που αναπτύχθηκε από τους Fischer *et al.*, (2001). Πρόκειται για μια έμμεσα-ανταγωνιστική μέθοδο η οποία χρησιμοποιεί αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν ως επίτοπο το αμινοξύ ADDA. Το συγκεκριμένο αμινοξύ αποτελεί μέρος του μορίου όλων των μικροκυστινών και των νοντουλαρινών και έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνο για την τοξική δράση των παραπάνω τοξινών.

Στα μικροπηγαδάκια τιτλοδότησης του ELISA kit που χρησιμοποιήθηκε, βρίσκονται ακινητοποιημένα σύμπλοκα ADDA – πρωτεΐνης, τα οποία ανταγωνίζονται με τις μικροκυστίνες των δειγμάτων για περιορισμένο αριθμό αντισωμάτων. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε πλεονεκτεί έναντι των παλαιότερων μεθόδων που χρησιμοποιούσαν μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα στο γεγονός ότι μπορεί να ανιχνεύσει μεγαλύτερο εύρος αναλόγων μικροκυστινών. Η μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου σε ένα πλήθος αναλόγων μικροκυστινών (Εικόνα 18) την καθιστά την πιο αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού των μικροκυστινών.



Εικόνα 17. ELISA KIT



Εικόνα 18.Πρότυπες καμπύλες της συγκέντρωσης διαφόρων αναλόγων μικροκυστινών.

Η κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Αρχικά προστέθηκαν στα πηγαδάκια τα προς ανάλυση δείγματα (50 μ l), και τα πρότυπα διαλύματα των μικροκυστινών (50 μ l). Καθένα από τα παραπάνω διαλύματα αντιπροσωπευόταν από δυο πηγαδάκια. Ακολούθησε η προσθήκη του πρώτου αντισώματος και η επώαση τους σε θερμοκρασία δωματίου για 90 λεπτά. Στο τέλος της επώασης τα πηγαδάκια εκπλύθηκαν τρεις φορές με το ειδικό διάλυμα έκπλυσης. Έπειτα, προστέθηκε σε κάθε πηγαδάκι το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με κατάλληλο ένζυμο (100 μ l) και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την εφαρμογή ενός δεύτερου σταδίου έκπλυσης, προστέθηκε το διάλυμα με το υπόστρωμα της αντίδρασης (100 μ l), στην οποία συμμετέχει το παραπάνω ένζυμο και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος της επώασης προστέθηκε το διάλυμα

τερματισμού της αντίδρασης (50 μ l) και μετρήθηκε η απορρόφηση των χρωμοφόρων προϊόντων της αντίδρασης, στα 450 nm με τη χρήση φωτομέτρου (Bio-Tek MWGAG). Σε κάθε δοκιμαστικό πηγαδάκι, υπάρχει ίσος αριθμός μορίων συμπλόκου ADDA –πρωτεΐνης και κάθε δοκιμαστικό πηγαδάκι λαμβάνει ίσο αριθμό αντισωμάτων. Επομένως, ένα δείγμα που περιέχει μικροκυστίνες σε χαμηλή συγκέντρωση επιτρέπει σε μεγαλύτερο αριθμό μορίων συμπλόκου ADDA –πρωτεΐνης να δεσμευτεί από τα αντισώματα και το αποτέλεσμα είναι εντονότερο χρώμα. Αντίστροφα, ένα δείγμα που περιέχει μικροκυστίνες σε υψηλή συγκέντρωση επιτρέπει σε μικρότερο αριθμό μορίων συμπλόκου ADDA –πρωτεΐνης να δεσμευτεί από τα αντισώματα και το αποτέλεσμα είναι λιγότερο έντονο χρώμα (Fischer *et al.*, 2001).

Η ικανότητα ανάκτησης της μεθόδου μετρήθηκε με την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων πριν και μετά την προσθήκη προτύπων διαλυμάτων μικροκυστίνης. Η βαθμονόμηση της μεθόδου και η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης έγινε με πρότυπα διαλύματα της μικροκυστίνης-LR συγκεντρώσεων: 0, 150 ng/l, 400 ng/l, 1000 ng/l, 2000 ng/l και 5000 ng/l. Η συγκέντρωση των μικροκυστινών που περιεχόταν στα δείγματα υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη.

3.4 Στατιστική ανάλυση

Όσον αφορά τα φυτά, τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν με One-way ANOVA ως προς την επίδραση της μεταχείρισης (νερό βρύσης-νερό Κάρλας). Σημαντικό θα ήταν να τονιστεί, ότι στην περίπτωση του αριθμού των φύλλων πραγματοποιήθηκε λογαριθμική μετατροπή των δεδομένων. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του IBM SPSS Statistics v.24.0 (IBM corp.).

Όσον αφορά τα έντομα, η θνησιμότητα των εντόμων αναλύθηκε με την διαδικασία των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων MANOVA – Fit με Wilk's Lambda με την χρήση του λογισμικού JMP (Sall *et. al.*, 2001) με το προϊόν και το χρόνο έκθεσης ως κύριους παράγοντες. Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με το κριτήριο Tukey-Kramer HSD test σε 0.05 και για του απογόνους (Sokal and Rohlf, 1995). Για τις

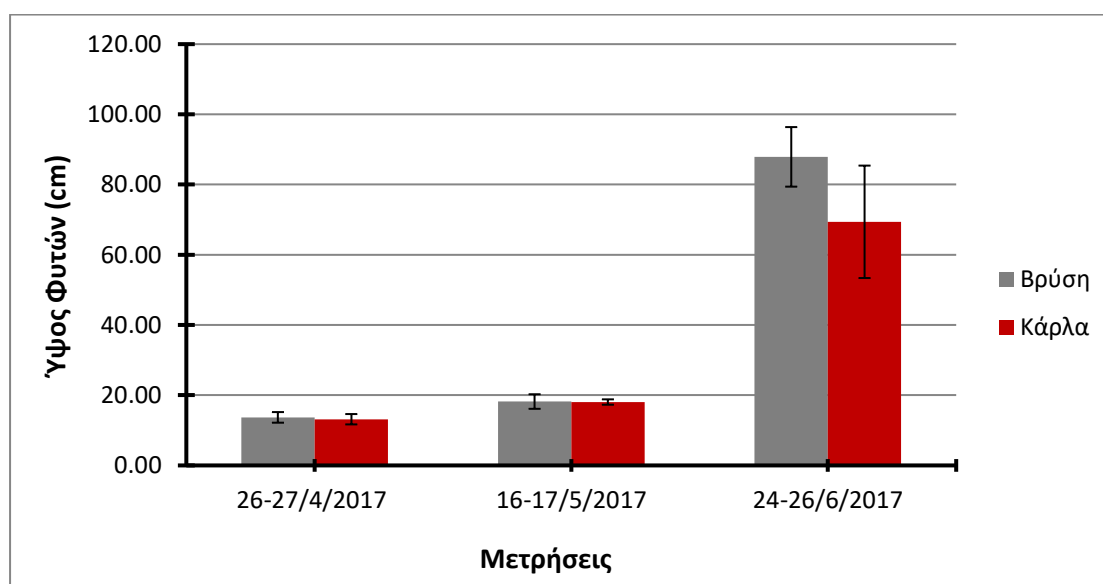
βιοδοκιμές επιλογής το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS (IBMv.24). Οι μέσοι διαχωρίστηκαν με το κριτήριο Tukey' b test με κύριο παράγοντα το χρόνο έκθεσης καθώς επίσης χρησιμοποιήθηκε και το paired sample t-test για την προτίμηση των εντόμων μεταξύ καλαμποκιού που είχε αρδευτεί με νερό Κάρλας και του Εργαστηρίου με $P < 0,05$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Φυτά

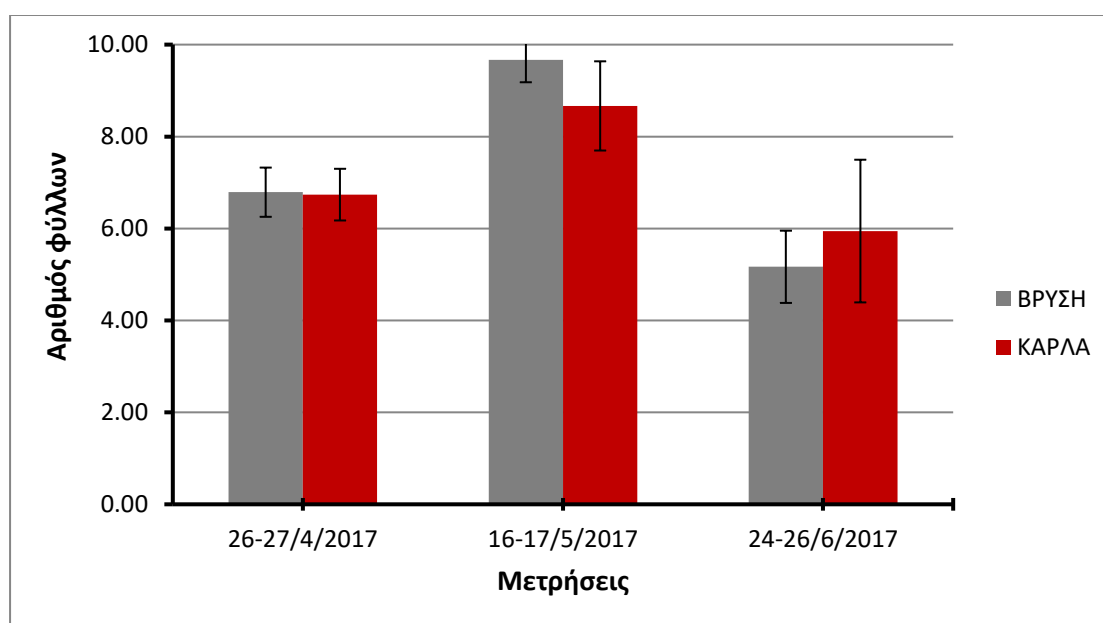
4.1.1. Μορφολογικά – αναπτυξιακά χαρακτηριστικά

Στο Γράφημα 1, παρουσιάζεται ο μέσος όρος του ύψους των φυτών κατά τις τρεις δειγματοληψίες για κάθε μεταχείριση. Σύμφωνα με το γράφημα, ο μέσος όρος του ύψους των φυτών της τρίτης μέτρησης ήταν υψηλότερος σε σύγκριση με τον μέσο όρο των υπόλοιπων μετρήσεων. Όσον αφορά τις μεταχειρίσεις (Βρύση, Κάρλα), τα φυτά της βρύσης φαίνεται να παρουσίασαν μεγαλύτερη τάση ως προς το ύψος σε σχέση με τα φυτά της Κάρλας.



Γράφημα 1: Μέσος Όρος Ύψους Φυτών (\pm τυπικό σφάλμα) των μεταχειρίσεων κατά τις τρεις μετρήσεις.

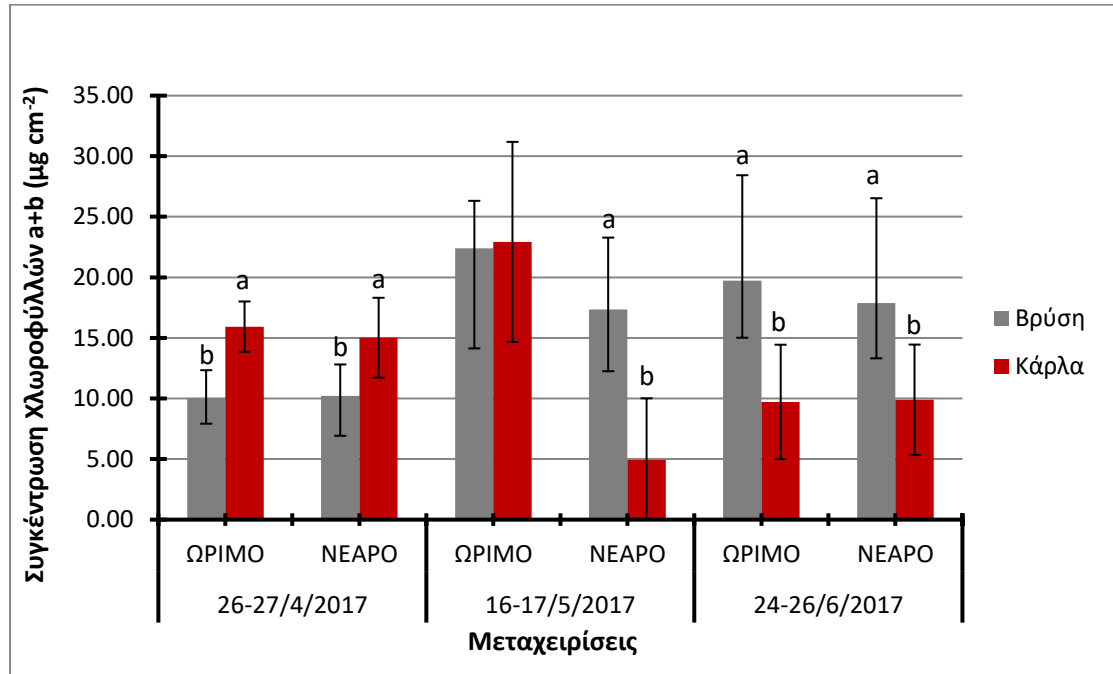
Επιπλέον, καταμετρήθηκε και ο μέσος όρος αριθμού των φύλλων σε κάθε δειγματοληψία για κάθε μεταχείριση. Όσον αφορά τις μετρήσεις, όπως παρουσιάζεται και στο 2^ο Γράφημα φαίνεται ότι οι επιμέρους μεταχειρίσεις (Βρύση, Κάρλα) δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές. Σημαντικό θα ήταν επίσης να τονιστεί, ότι τα δεδομένα δεν πληρούσαν την κανονική κατανομή, για το λόγο αυτό υπολογίστηκε ο λογάριθμός τους και έπειτα ολοκληρώθηκε ο παραμετρικός έλεγχος ANOVA.



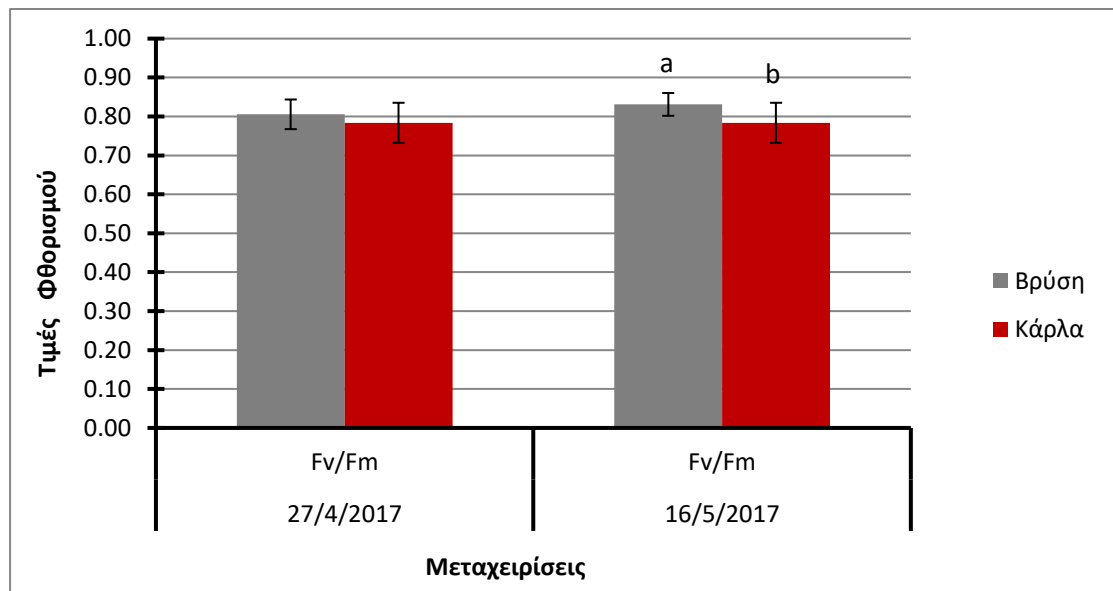
Γράφημα 2: Μέσος Όρος Αριθμού Φύλλων Φυτών (\pm τυπικό σφάλμα) των μεταχειρίσεων κατά τις τρεις μετρήσεις.

Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 3, σε ότι αφορά τις συγκεντρώσεις των φωτοσυνθετικών χρωστικών οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a και b που καταγράφηκαν για την 1η μέτρηση παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων (Βρύση, Κάρλα) τόσο για το ώριμο ($F= 68,54$, $p<0,05$) όσο και για το νεαρό φύλλο ($F= 24,81$, $p<0,05$). Αντίστοιχη εικόνα παρουσίασαν τα δεδομένα της 3ης μέτρησης (για το ώριμο $F= 7,63$, $p<0,05$ και για το νεαρό $F=4,91$, $p<0,05$). Κατά τη 2η μέτρηση όμως, οι συγκεντρώσεις των φωτοσυνθετικών χλωροφυλλών a και b του ώριμου των μεταχειρίσεων δεν διέφεραν στατιστικά, σε αντίθεση με το νεαρό φύλλο όπου παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ($F= 45,37$, $p<0,05$). Με εξαίρεση των συγκεντρώσεων του ώριμου φύλλου της 2ης Μέτρησης, παρατηρούμε πως το

νερό από τη λίμνη Κάρλα με την πάροδο του χρόνου προκάλεσε σημαντική μείωση της χλωροφύλλης αρχικά στα νεαρά φύλλα και έπειτα σε φύλλα όλων των ηλικιακών ομάδων.



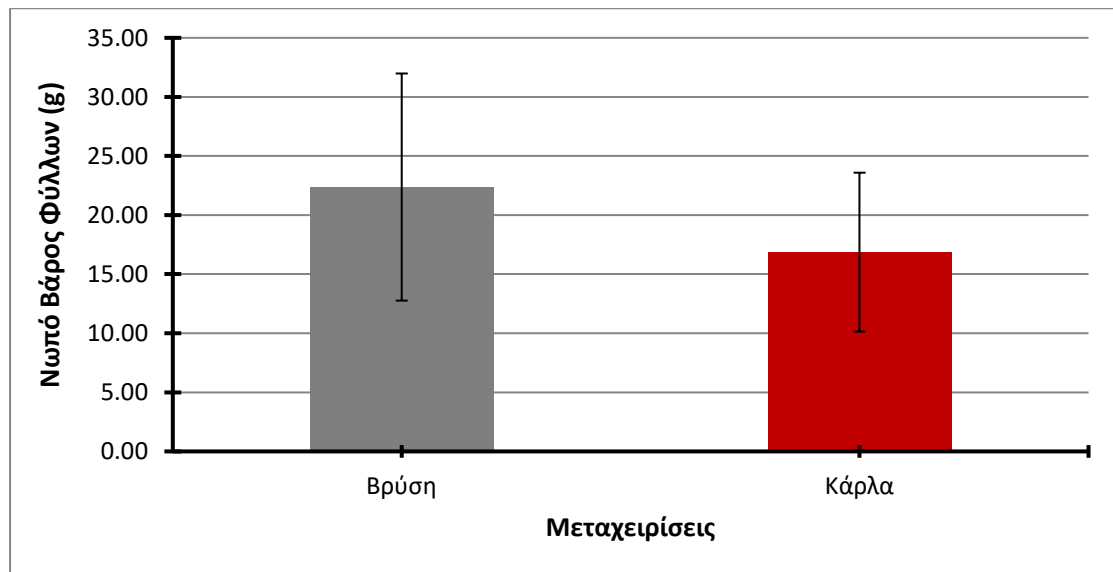
Γράφημα 3: Μέσος όρος χλωροφύλλης a + b ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (\pm τυπικό σφάλμα) σε δυο φύλλα των μεταχειρίσεων κατά τις τρεις μετρήσεις. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (για $p < 0,05$).



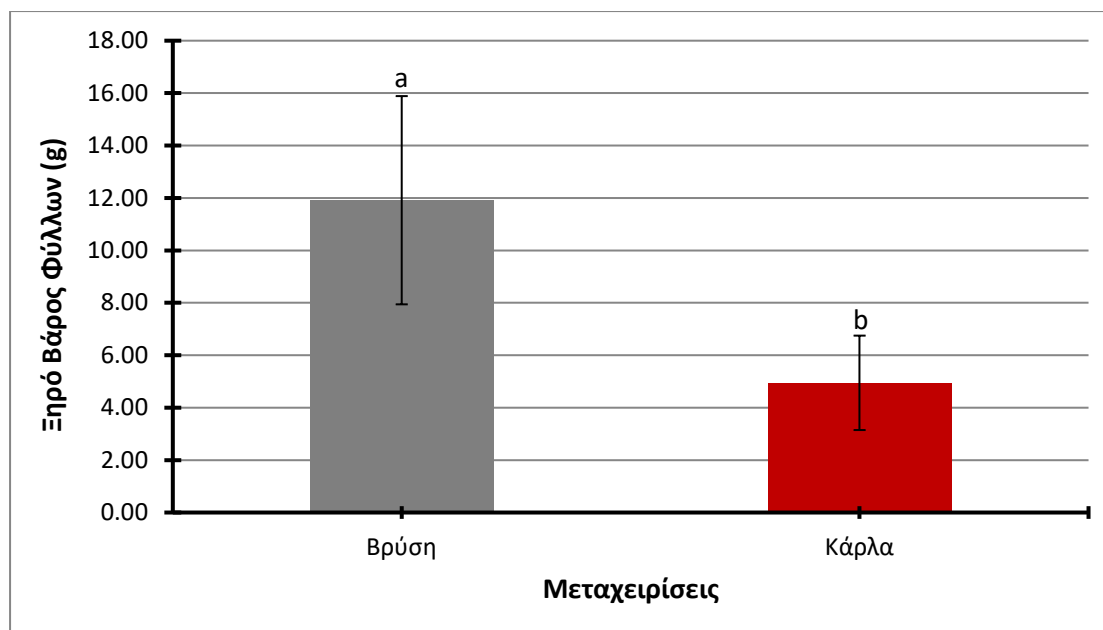
Γράφημα 4: Μέσος όρος του λόγου: μέγιστος μεταβαλλόμενος φθορισμός (FV)/ μέγιστη τιμή φθορισμού (FM) (\pm τυπικό σφάλμα) των μεταχειρίσεων κατά τις δυο μετρήσεις. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (για $p < 0,05$).

4.1.2. Τελική Συλλογή

Στο Γράφημα 4 και στο Γράφημα 5 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι του νωπού βάρους και του ξηρού βάρους των φύλλων αντίστοιχα. Όσον αφορά το νωπό βάρος των φύλλων παρατηρούμε ότι δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων. Αντίθετα, το ξηρό βάρος των φύλλων παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($F= 16,95$, $p<0,05$) με τα φυτά της βρύσης να παρουσιάζουν σχεδόν τριπλάσια τιμή βιομάζας από τα φυτά της Κάρλας.

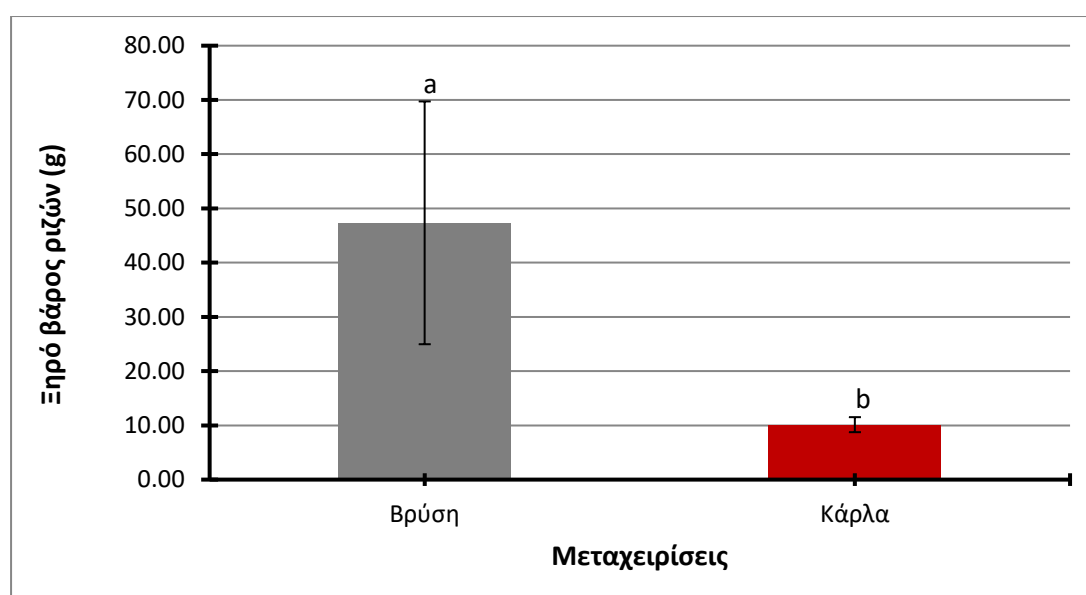


Γράφημα 5: Μέσος όρος νωπού βάρους φύλλων (g) (\pm τυπικό σφάλμα) των μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή.



Γράφημα 6: Μέσος όρος ξηρού βάρους φύλλων (g) (\pm τυπικό σφάλμα) των Μεταχειρίσεων κατά την τελική συλλογή. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (για $p < 0,05$).

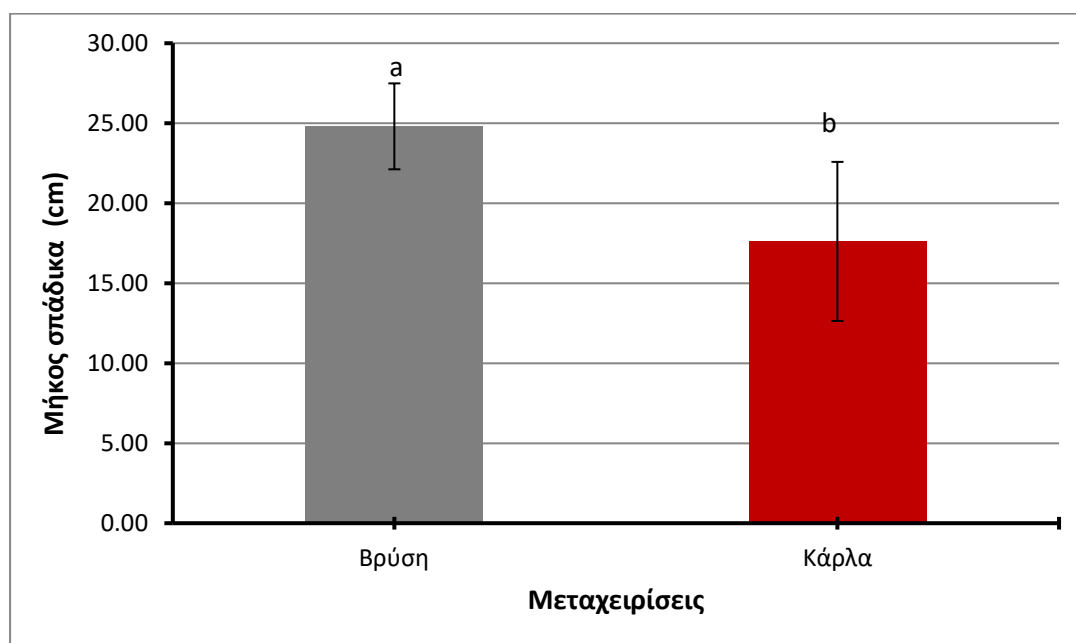
Επιπλέον, όπως παρατηρούμε και στο παραπάνω γράφημα (6^ο Γράφημα), ο μέσος όρος του ξηρού βάρους των ριζών των φυτών που αρδεύονταν με νερό βρύσης είναι σημαντικά υψηλότερος από αυτόν της μεταχείρισης της Κάρλας ($F=15,58$, $p < 0,05$).



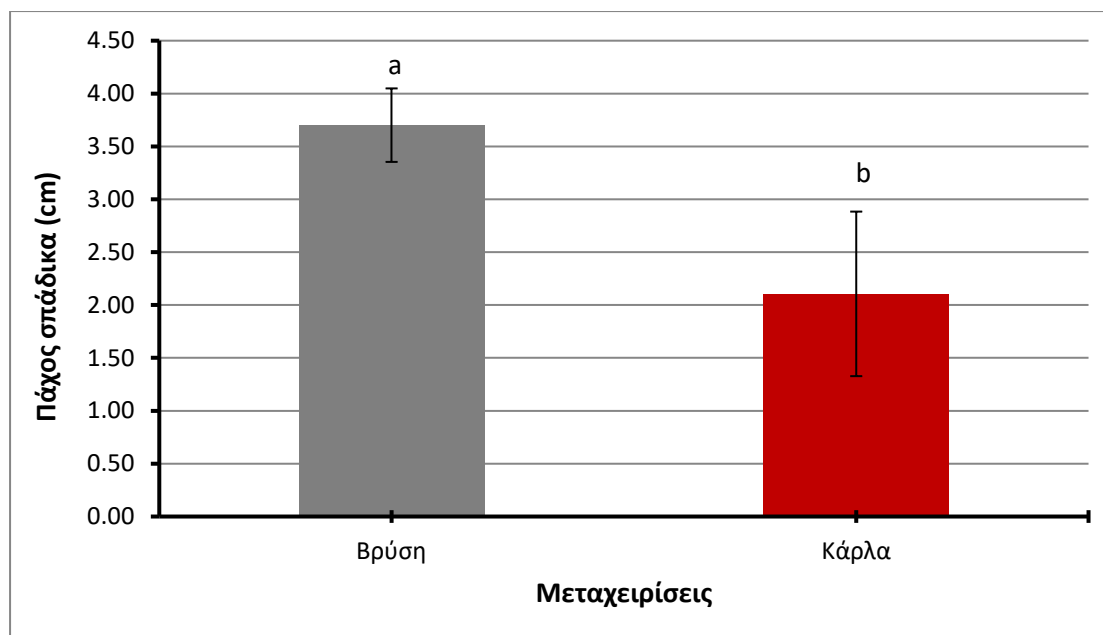
Γράφημα 7: Μέσος Όρος Ξηρού Βάρους Ριζών (g) (\pm τυπικό σφάλμα) των δυο μεταχειρίσεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (για $p < 0,05$).

Όσον αφορά το στάδιο ωρίμανσης, τα φυτά που αρδεύονταν με νερό βρύσης εμφάνισαν πρώτα τόσο την αρσενική ταξιανθία (φόβη) όσο και τη θηλυκή, σε αντίθεση με τα φυτά της άλλης μεταχείρισης που καθυστέρησαν στην ανάπτυξη αναπαραγωγικών οργάνων. Επιπλέον, τα φυτά αραβόσιτου που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα κατά το στάδιο σχηματισμού του καρπού ('δέσιμο του σπόρου') εμφάνισαν και δεύτερη θηλυκή ταξιανθία.

Ο μέσος όρος του μήκους του σπάδικα (Γράφημα 7) της μεταχείρισης της Βρύσης είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο της μεταχείρισης της Κάρλας, αφού ($F=63,1$, $p<0,05$). Αντίστοιχη διαφορά παρατηρείται και στο πάχος του σπάδικα (Γράφημα 8) ($F=29,18$, $p<0,05$).

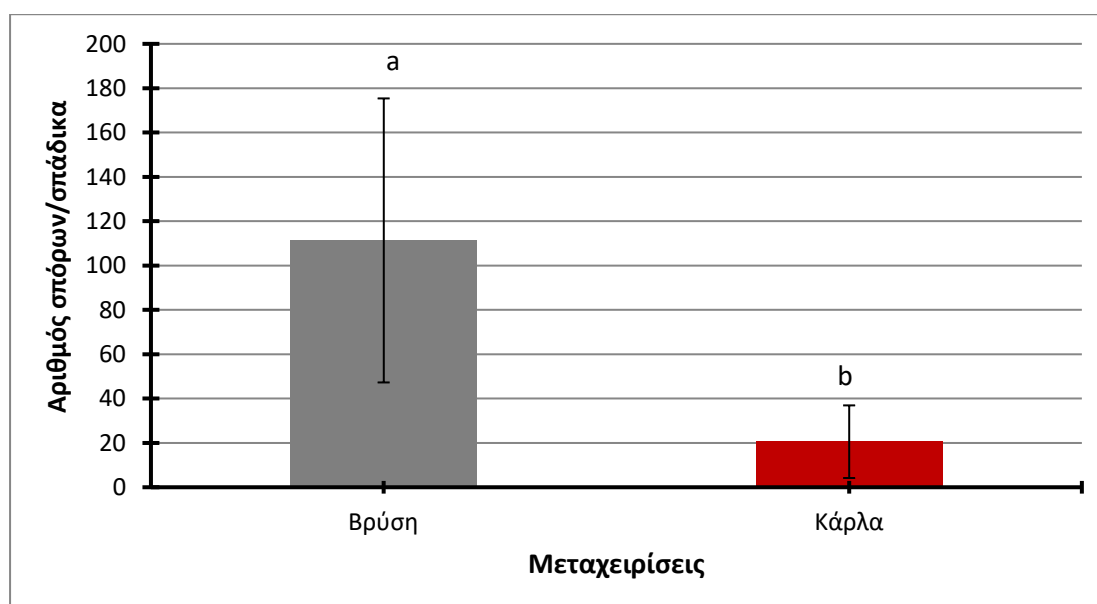


Γράφημα 8: Μέσος όρος μήκους σπάδικα (cm) (\pm τυπικό σφάλμα) των δυο μεταχειρίσεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (για $p<0,05$).

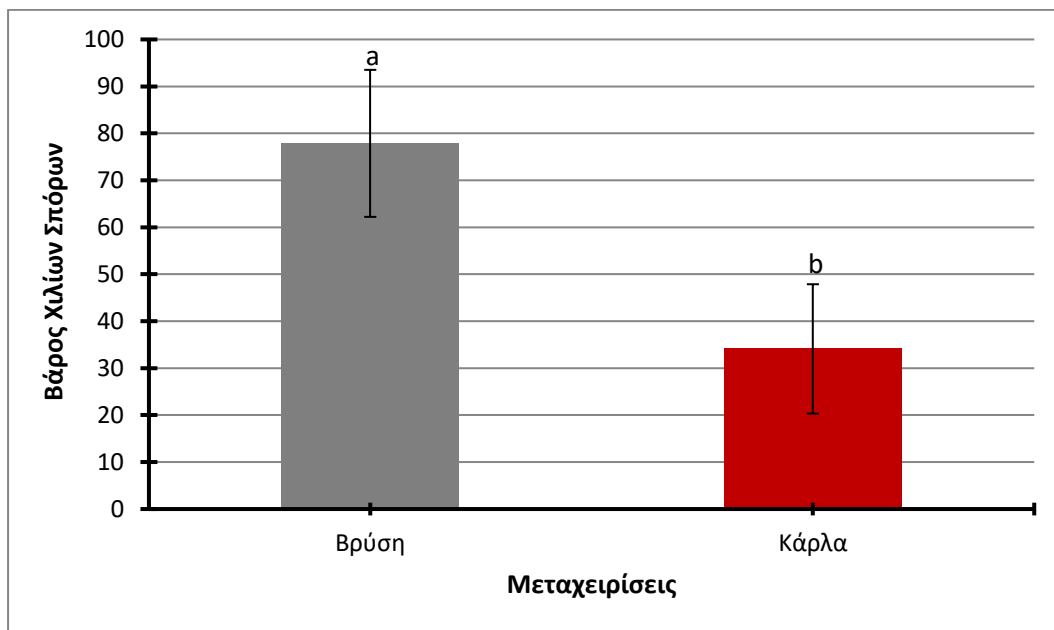


Γράφημα 9: Μέσος Όρος πάχους σπάδικα (cm) (\pm τυπικό σφάλμα) των δυο μεταχειρίσεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (για $p < 0,05$).

Τέλος, όπως παρατηρείται και στα παρακάτω γραφήματα (Γράφημα 9 και 10) τα φυτά της Βρύσης εκτός από μεγαλύτερο σπάδικα έφεραν και σημαντικά περισσότερους σπόρους ανά σπάδικα, σε σύγκριση με τη μεταχείριση της Κάρλας ($F=17,2$, $p < 0,05$). Η ίδια εικόνα παρατηρείται και με το βάρος χιλίων σπόρων ($F=50,56$, $p < 0,05$).



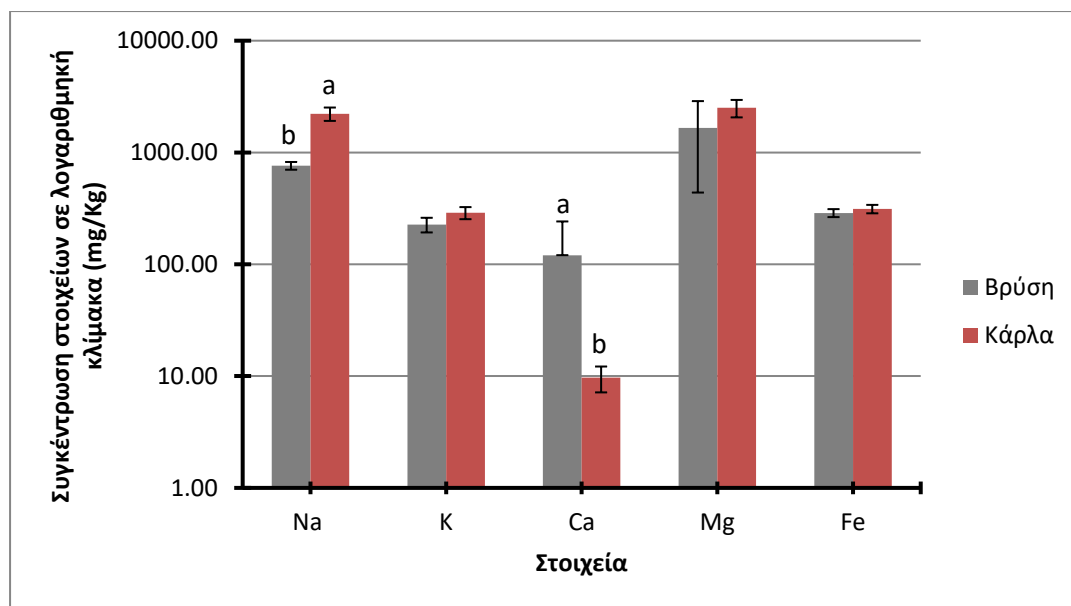
Γράφημα 10: Μέσος όρος αριθμού σπόρων (\pm τυπικό σφάλμα) των μεταχειρίσεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (για $p < 0,05$).



Γράφημα 11: Μέσος όρος βάρους χιλίων σπόρων (\pm τυπικό σφάλμα) των μεταχειρίσεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (για $p < 0,05$).

4.1.3.Φυλλοδιαγνωστική

Έπειτα από τον έλεγχο της συγκέντρωσης (mg/Kg) των στοιχείων: Na, K, Ca, Mg, Fe στο φυτικό ιστό δειγμάτων τόσο από φυτά της βρύσης, όσο και από φυτά της λίμνης Κάρλας, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση σχεδόν όλων των στοιχείων εκτός του Na και του Ca, μεταξύ των μεταχειρίσεων δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά. Πιο αναλυτικά, όσον αφορά το Na ($F = 66,5$, $p < 0,05$) και Ca ($F = 10,83$, $p < 0,05$).



Γράφημα 11: Συγκέντρωση στοιχείων (\pm τυπικό σφάλμα) στο φυτικό ιστό φυτών των δυο μεταχειρίσεων. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (για $p < 0,05$).

4.2 Ανάλυση νερού

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της συγκέντρωσης (mg/L) των στοιχείων: Na, K, Ca, Mg, Fe στα είδη νερού που χρησιμοποιήθηκαν για την άρδευση των φυτών του συγκεκριμένου πειράματος (νερό βρύσης, νερό από τη λίμνη Κάρλα). Πιο αναλυτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4):

Πίνακας 4. Ανάλυση νερού από τη βρύση και από τη λίμνη Κάρλα.

Μεταχείριση	Συγκέντρωση στοιχείων (mg/L)			
	Na	K	Ca	Mg
Νερό βρύσης	49,5	1,5	64,7	1,17
Νερό Κάρλας	438,5	12,3	29,7	2,79

4.3 Προσδιορισμός μικροκυστινών στο νερό και στους σπόρους

Με τη χρήση της ενζυμοσυνδεόμενης ανοσοπροσροφητικής τεχνικής προσδιορίστηκε ποσοτικά η συγκέντρωση των μικροκυστινών τόσο στο τελικό προϊόν παραγωγής (σπόροι) των φυτών αραβόσιτου που παράχθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, όσο και στο νερό από τη λίμνη Κάρλα και το νερό βρύσης αντίστοιχα, με τα οποία αρδεύονταν τα υπό μελέτη φυτά. Παρατηρήθηκε, ότι τόσο στους σπόρους των φυτών αραβόσιτου που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα όσο και στους σπόρους που συλλέχθηκαν από το αγροτεμάχιο στο Ριζόμυλο, ανιχνεύθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών. Αντίστοιχη εικόνα παρουσίασαν και τα είδη νερού που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος. Επιπλέον, υπολογίστηκε τόσο η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη μικροκυστίνης (**EDI**), όσο και το αποδεκτό ανώτατο όριο ανθρώπινης κατανάλωσης μικροκυστινών σε ημερήσια βάση (**TDI**). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικότερα στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5):

Πίνακας 5. Συγκέντρωση μικροκυστινών στους σπόρους και στο νερό του

	MCYST (ng/g)	EDI	TDI
Καλαμπόκι (νερό βρύσης)	0	0	0
Καλαμπόκι εργαστηρίου εντομολογίας (αρνητικός έλεγχος)	0	0	0
Καλαμπόκι (νερό Κάρλας)	4056,1	2,7	67,6
Καλαμπόκι (από το αγροτεμάχιο)	259,1	0,17	4,3
Νερό Κάρλας intra-celluar	10.2 (μg/l)		

Νερό Κάρλας extra-celluar	3.76 (μg/l)
Νερό βρύσης	0 (μg/l)

όπου, στη στήλη με το **EDI** (εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη μικροκυστίνης), παρουσιάζεται η συγκέντρωση μικροκυστίνης στον καρπό (μg/g)*βάρος μερίδας (g)]/βάρος καταναλωτή (kg) (για άτομο 60kg που καταναλώνει 100g (νωπού βάρους)) ανά ημέρα

και στήλη με **TDI**(αποδεκτό ανώτατο όριο ανθρώπινης κατανάλωσης μικροκυστινών σε ημερήσια βάση (Tolerable Daily Intake, TDI) όπως ορίστηκε από τον WHO (1998) η τιμή του οποίου είναι μέχρι 0,04 μg/Kg σωματικού βάρους) η οποία παρουσιάζει τις φορές που υπερβαίνει η συγκέντρωση των μικροκυστινών σε κάθε μεταχείριση το ανώτατο αποδεκτό όριο.

4.4 Έντομα

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών όσον αφορά τη θνησιμότητα, την παραγωγή απογόνων, αλλά και τη μελέτη συμπεριφοράς των εντόμων αποθηκών που τρέφονται με σπόρους από φυτά που αρδεύονταν με νερό βρύσης, με εκείνους που συλλέχθηκαν από το αγροτεμάχιο του Ριζόμυλου αλλά και με σπόρους του εργαστηρίου εντομολογίας (αρνητικός έλεγχος). Για τα *P. truncatus* και *S. zeamais* όλες οι επιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις ήταν σημαντικές (Πίνακας 6). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, γενικά η αύξηση του χρόνου έκθεσης αύξησε τη θνησιμότητα ανεξαρτήτως προϊόντος και είδους εντόμου. Το ποσοστό θνησιμότητας στα *P. truncatus* και *S. zeamais* την 1^η ημέρα σε καλαμπόκι που είχε αρδευτεί με νερό της Βρύσης, ήταν γενικά πολύ χαμηλή (Πίνακας 7). Κατά την 7^η ημέρα μέτρησης στο *P.*

truncatus, στο καλαμπόκι του αγροτεμάχου, η θνησιμότητα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τις άλλες δύο μεταχειρίσεις. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και στην περίπτωση της 14^{ης} ημέρας έκθεσης, ενώ στις άλλες δύο μεταχειρίσεις (Εργαστηρίου και Βρύσης) τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν παρόμοια. Για το *S. zeamais*, παρόλο που δεν καταγράφηκε θνησιμότητα κατά την 1^η μέρα έκθεσης, η θνησιμότητα ήταν, όπως και στην περίπτωση του *P. truncatus*, σημαντικά μεγαλύτερη στο καλαμπόκι του αγροτεμάχου, σε σχέση αυτή των άλλων μεταχειρίσεων. Μάλιστα, το ποσοστό θνησιμότητας στο καλαμπόκι του αγροτεμάχου έφτασε το 98% μετά από 14 ημέρες έκθεσης (Πίνακας 7).

Πίνακας 6: Παράμετροι της πολλαπλής ανάλυσης της διασποράς (MANOVA) για τα *Prostephanus truncatus* και *Sitophilus zeamais* (με βαθμούς ελευθερίας: 9).

	<i>S. zeamais</i>			<i>P. truncatus</i>	
	df	F	P	F	P
Μεταξύ μεταβλητών	2	73.99	<0.01	15.27	<0.01
Τιμή αποκοπής	1	204.71	<0.01	284.77	<0.01
Προϊόν	2	73.99	<0.01	15.27	<0.01
Μέσα στις μεταβλητές	4	13.73 ^a	<0.01	8.47 ^a	<0.01
Χρόνος	2	117.83	<0.01	151.77	<0.01
Χρόνος x Προϊόν	4	13.73 ^a	<0.01	8.47 ^a	<0.01

^a Wilks' Lamda approximate F value.

Πίνακας 7. Μέσος όρος θνησιμότητας (% \pm τυπικό σφάλμα) ενηλίκων ατόμων των *Prostephanus truncatus* και *Sitophilus zeamais* μετά από 1, 7 and 14 ημέρες έκθεσης σε τρεις τύπους καλαμποκιού (Εργαστηρίου, Βρύσης και Αγροτεμάχιου Ριζόμυλου) (με βαθμούς ελευθερίας: 2).

Προϊόν	<i>P. truncatus</i>			<i>S. zeamais</i>		
	1 ^η	7 ^η	14 ^η	1 ^η	7 ^η	14 ^η
Εργαστηρίου	2.5 \pm 2.5	25.0 \pm 2.8 b	42.5 \pm 2.5 b	0.0 \pm 0.0	5.0 \pm 3.5 b	12.5 \pm 1.4 b
Βρύσης	5.0 \pm 2.8	21.2 \pm 4.2 b	47.5 \pm 5.9 b	0.0 \pm 0.0	21.2 \pm 7.1 b	32.5 \pm 8.5 b
Αγροτεμάχιο	0.0 \pm 0.0	56.2 \pm 4.2 a	80.5 \pm 8.6 a	0.0 \pm 0.0	91.5 \pm 7.1 a	97.5 \pm 1.4 a
F	1.28	24.73	11.07	-	54.50	76.86
P	0.30	<0.01	<0.01	-	<0.01	<0.01

Σε κάθε στήλη, οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-Kramer HSD test με $P = 0.05$. Όπου δεν υπάρχουν γράμματα, δεν σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Γενικά, οι απόγονοι του *S. zeamais* ήταν περισσότεροι σε σχέση με το *P. truncatus*, ανεξάρτητα από τη μεταχείριση (Πίνακας 8). Επιπροσθέτως, και για τα δύο είδη, σημαντικά μικρότερος αριθμός απογόνων σημειώθηκε στο καλαμπόκι που συλλέχθηκε από το αγροτεμάχιο, σε σχέση με τις άλλες δύο μεταχειρίσεις, για τις οποίες ο αριθμός των απογόνων ήταν παρόμοιος.

Πίνακας 8. Μέσος όρος απογόνων (αριθμός ακμαίων ανά φιαλίδιο \pm τυπικό σφάλμα) των *Prostephanus truncatus* και *Sitophilus zeamais* μετά από 65 ημέρες σε τρεις τύπους καλαμποκιού (Εργαστηρίου, Βρύσης και Αγροτεμάχιου Ριζόμυλου).

Προϊόν	Παραγωγή απογόνων	
	<i>P. truncatus</i>	<i>S. zeamais</i>
Εργαστηρίου	11.0 \pm 0.7 a	41.5 \pm 5.5 a
Βρύσης	11.7 \pm 0.9 a	45.0 \pm 15.0 a
Αγροτεμάχιο	4.5 \pm 1.5 b	1.5 \pm 1.1 b
F	12.5	6.8
P	<0.01	0.01

Σε κάθε στήλη, οι μέσοι όροι που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το κριτήριο Tukey-KramerHSD test με $P = 0.05$. Όπου δεν υπάρχουν γράμματα, δεν σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Ακολουθεί η καταγραφή των προτιμήσεων των εντόμων όταν αφέθηκαν να διαλέξουν μεταξύ καλαμποκιού του αγροτεμάχιου και καλαμποκιού Εργαστηρίου (Πίνακας 9). Δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο σπόρων καλαμποκιού γεγονός που παρατηρήθηκε τόσο στο *P. truncatus* και στο *S.*

zeamais. Φαίνεται ότι προτίμησαν και τα δυο είδη καλαμποκιού. Σε γενικές γραμμές, για το *P. truncatus* σημαντικά περισσότερα ακμαία καταγράφηκαν στο καλαμπόκι του αγροτεμάχιου σε σχέση με το καλαμπόκι Εργαστηρίου μόνο σε κάποια από τα διαστήματα παρατήρησης, ενώ γενικά, τα ποσοστά ήταν παρόμοια (Πίνακας 9). Παρόμοια ήταν και τα ποσοστά στην περίπτωση του *S. zeamais*, με εξαίρεση τα 60 λεπτά, όπου βρέθηκαν σημαντικά λιγότερα ακμαία στο καλαμπόκι του αγροτεμάχιου, σε σχέση με το καλαμπόκι Εργαστηρίου.

Πίνακας 9. Ποσοστά (%) των ακμαίων *Prostephanus truncatus* και *Sitophilus zeamais* που καταγράφηκαν σε καλαμπόκι που συλλέχθηκε από το αγροτεμάχιο του Ριζόμυλου, σε πειράματα επιλογής κατά τη διάρκεια των διαστημάτων παρατήρησης (το υπόλοιπο ποσοστό αντιστοιχεί σε καλαμπόκι Εργαστηρίου).

Χρόνος έκθεσης (λεπτά)	<i>P. truncatus</i>	<i>S. zeamais</i>
5	60.8 ± 6.5	50.0 ± 7.3
10	60.0 ± 8.3	48.3 ± 4.0
15	67.5 ± 6.1*	43.3 ± 4.6
20	68.3 ± 9.1	41.6 ± 6.6
25	65.0 ± 8.6	41.6 ± 6.4
30	62.5 ± 8.5	49.1 ± 3.5
35	67.5 ± 8.2	44.1 ± 7.1
40	62.5 ± 8.3	45.0 ± 5.4
45	71.6 ± 5.5*	40.8 ± 7.4
50	49.1 ± 7.4	39.1 ± 5.8
55	44.1 ± 9.6	41.6 ± 6.6
60	54.1 ± 6.3	40.0 ± 4.0*
F	1.096	0.384
P	0.380	0.957

Σε κάθε χρόνο έκθεσης και για κάθε έντομο ξεχωριστά, ο αστερίσκος υποδηλώνει σημαντικά διαφορετικό ποσοστό (μεγαλύτερο ή μικρότερο) ατόμων που βρέθηκαν σε αραβόσιτο που είχε αρδευτεί με νερό Κάρλας, σε σχέση με τον αραβόσιτο Εργαστηρίου (Όπου δεν υπάρχει αστερίσκος, δεν σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές (μονόπλευρη δοκιμασίας του *t*; *df* = 5, *n*=6, με *P* = 0.05).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η επίδραση του νερού της λίμνης Κάρλας τόσο σε φυτά αραβόσιτου όσο και σε έντομα αποθηκών. Όσον αφορά τα φυτά, παρατηρήθηκε ότι η έκθεση των φυτών αραβόσιτου σε αρδευτικό νερό πλούσιο σε κυανοτοξίνες, επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των φυτών. Αυτό παρατηρήθηκε από την αρχή του πειράματος, καθώς στην ομάδα της βρύσης τα αρτίβλαστα εκπύχθηκαν πιο γρήγορα, ενώ καταγράφηκε και μεγαλύτερο ποσοστό φύτευσης σε σχέση με την ομάδα της Κάρλας. Ανάλογα αποτελέσματα εμφανίστηκαν και στις τελικές μετρήσεις της επιμέρους βιομάζας του υπέργειου και υπόγειου τμήματος του φυτού αλλά και του σπάδικα και των σπόρων αυτού όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στα φυτά της Κάρλας σε σχέση με αυτά της βρύσης. Επιπλέον, στην παρούσα έρευνα, ενδιαφέρουσα απόκριση καταγράφηκε ως προς τις συγκεντρώσεις κάποιων φωτοσυνθετικών χρωστικών. Οι ομάδες της Κάρλας εμφάνισαν αρχικά αύξηση των χλωροφυλλών και έπειτα μείωση σε σχέση με τις ομάδες της βρύσης. Τέλος, όσον αφορά το φθορισμό των χλωροφυλλών (F_v/F_m), παρατηρήθηκαν μειωμένες τιμές στα φυτά που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα σε σύγκριση με αυτές των φυτών που αρδεύονταν με νερό βρύσης, γεγονός που παρουσιάζει μια εικόνα μειωμένης απόδοσης του PSII, μια ένδειξη δηλαδή πρόωρου stress των φυτών.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης του νερού της Κάρλας συνάδουν με αυτά του Pflugmacher (2007), ο οποίος παρατήρησε αναστολή της βλάστησης, καθώς και του μήκους των ριζών και των βλαστών έπειτα από την έκθεση στην τοξίνη επίσης σε φυτά αραβόσιτου. Επιπλέον, οι Saqrane *et al.* (2009) εξέτασαν τις φυσιολογικές μεταβολές που προκλήθηκαν στα φυτά: *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* και σε ποικιλίες του *Lens esculenta*, οι οποίες προκλήθηκαν από νερό μολυσμένο με μικροκυστίνες. Έπειτα από έκθεση 30 ημερών, το εκχύλισμα μικροκυστινών αναφέρθηκε ότι προκάλεσε μειωμένη ανάπτυξη και παραγωγικότητα, καθώς και επιβλαβείς επιδράσεις στην ανάπτυξη και στη λειτουργία του PSII, γεγονός που εκφράστηκε σύμφωνα με τον λόγο F_v / F_m κατά τη μέτρηση του φθορισμού της

χλωροφύλλης. Παρ'όλα αυτά η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη δεν παρουσίασε διαφορές και η συσσώρευση Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , P και N βελτιώθηκε.

Η αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών αραβόσιτου της παρούσας μελέτης που εκτέθηκαν στις μικροκυστίνες πιθανώς να σχετίζεται και με το γεγονός ότι η άρδευση με νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες πραγματοποιήθηκε από την αρχή της σποράς. Επίσης, μεγάλη ήταν και η χρονική διάρκεια έκθεσης των φυτών στις τοξίνες καθώς διήρκεσε σε όλη την αναπτυξιακή περίοδο, περίπου 90 ημέρες, μέχρι την ολοκλήρωση της καρποφορίας (δέσιμο του καρπού). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι οι Bibo *et al.* (2008), αλλά και οι Levizou *et al.* (2017) τεκμηρίωσαν ότι η αυξημένη ευαισθησία των φυτών στις μικροκυστίνες εξαρτάται τόσο από το αναπτυξιακό στάδιο των φυτών, όσο και από το είδος των φυτών και τη διάρκεια έκθεσης μέσω της άρδευσης. Συνεπώς, οι επιπτώσεις των μικροκυστινών είναι ισχυρά δοσο-εξαρτώμενες, γεγονός που σημαίνει ότι οι καλλιέργειες με χαμηλή συχνότητα άρδευσης με νερό πλούσιο σε μικροκυστίνες μπορεί να υποστούν μικρότερες επιπτώσεις σε σχέση με τις καλλιέργειες με υψηλή συχνότητα άρδευσης.

Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι η υψηλή τιμή αλατότητας του νερού της Κάρλας επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη των φυτών. Φαίνεται ότι η συγκεκριμένη ποικιλία αραβόσιτου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην αλατότητα, όπως διαπιστώθηκε από τις μετρήσεις κατά την φυλλοδιαγνωστική. Ενδεχομένως τα αρνητικά αποτελέσματα που καταγράφηκαν στην ανάπτυξη των φυτών της Κάρλας να οφείλονται περισσότερο στην τοξικότητα Na παρά στην αυξημένη συγκέντρωση κυανοτοξινών.

Όσον αφορά τη συγκέντρωση μικροκυστινών στο νερό από τη λίμνη Κάρλα θεωρείται υψηλό (intra-celluar : 10.2 (μg/L), extra-celluar: 3.76 (μg/L)). Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και για τους σπόρους (>TDI:0,04 μg/Kg, W.H.O. 1998), τόσο για αυτούς που παράχθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, όσο και για αυτούς που συγκομίστηκαν από το αγροτεμάχιο στο χωριό Ριζόμυλος. Η συσσώρευση των μικροκυστινών μέσω της διατροφής, η οποία αποτελεί και την κύρια οδό έκθεσης των ανθρώπων στις παραπάνω τοξίνες, έχει επίσης πολύ μεγάλη σημασία στη μεταφορά και την πιθανή βιομεγέθυνση των μικροκυστινών μέσω της τροφικής αλυσίδας (Ibelings *et al.*, 2005). Η ιδιαίτερα αυξημένη συγκέντρωση

μικροκυστινών που υπολογίστηκε τόσο στους σπόρους που αρδεύονταν με νερό από τη λίμνη Κάρλα, όσο στους σπόρους που συλλέχθηκαν από το αγροτεμάχιο του Ριζομυλου (67,6 και 4,3 φορές αντίστοιχα μεγαλύτερη από το ανώτατο επιτρεπτό όριο (TDI)), χρήζει ιδιαίτερης προσοχής εξαιτίας της αυξημένης επικινδυνότητας για τον ανθρώπινο οργανισμό στην περίπτωση κατανάλωσης των σπόρων σε νωπή μορφή. Σημαντικό θα ήταν να αναφερθεί ότι μέσω της συγκεκριμένης διατριβής παρουσιάζεται ενδιαφέρον σχετικά με τον έλεγχο όλης της γραμμής προϊόντων αραβόσιτου, μέχρι το τελικό προϊόν προς ανθρώπινη κατανάλωση (π.χ. κονσερβοποιημένο), ώστε να προκύψουν επιπλέον στοιχεία σχετικά με την συγκέντρωση μικροκυστινών έπειτα από τις αντίστοιχες κατεργασίες.

Συνοψίζοντας σε ότι αφορά τις επιδράσεις του νερού της Κάρλας στα φυτά, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η σημαντικότερη αρνητική επίδρασή του στην ανάπτυξη μπορεί να οφείλεται στην ακαταλληλότητά του για άρδευση λόγω της υψηλής αλατότητας. Εντούτοις, η υψηλή συγκέντρωση μικροκυστινών στο νερό της λίμνης άφησε τα αποτυπώματά της στο φυτό, όπως μετρήθηκε στους σπόρους, καθώς παρατηρήθηκε πολύ αυξημένη βιοσυσσώρευση των μελετούμενων τοξινών.

Όσον αφορά τα έντομα, στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή τα θέματα που ερευνήθηκαν αφορούν τη θνησιμότητα, την παραγωγή απογόνων, και τη μελέτη συμπεριφοράς των εντόμων αποθηκών που τρέφονται με σπόρους αραβόσιτου α) από φυτά που καλλιεργήθηκαν σε αγροτεμάχιο στο χωριό Ριζόμυλο- κοντά στη λίμνη- οι οποίοι έφεραν σημαντικό φορτίο μικροκυστινών, σε σχέση με β) από φυτά που αρδεύτηκαν με νερό Βρύσης στο πλαίσιο του παρόντος πειράματος καθώς επίσης και με γ) το καλαμπόκι του εργαστηρίου εντομολογίας. Τα αποτελέσματα δείχνουν την σταδιακή αύξηση της θνησιμότητας των *P. truncatus* και *S. zeamais* στην πάροδο του χρόνου, στους σπόρους αραβόσιτου που είχαν αρδευτεί με νερό της λίμνης Κάρλας αλλά και σε αυτούς του αγροτεμαχίου Ριζόμυλου. Αντιθέτως, δεν καταγράφηκαν διαφορές ανάμεσα στις άλλες δύο μεταχειρίσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Η αυξημένη θνησιμότητα είχε και άμεση σχέση με την παραγωγή απογόνων, όπου οι χαμηλότεροι αριθμοί απογόνων καταγράφηκαν τόσο στο καλαμπόκι που είχε αρδευτεί με νερό Κάρλας, όσο και σε αυτούς του αγροτεμαχίου. Παρόλα αυτά, είναι πιθανόν οι διαφορές αυτές να συνδέονται περισσότερο με τη θνησιμότητα των αρχικών ακμαίων, παρά

με τη μειωμένη δυνατότητα ανάπτυξης των απογόνων σε κάποιο από τα ενδιαιτήματα. Περαιτέρω πειραματισμός είναι αναγκαίος για να αποσαφηνίσει τη βάση αυτής της υπόθεσης. Τόσο η αυξημένη θνησιμότητα όσο και η μειωμένη παραγωγή απογόνων σχετίζεται άμεσα με την έκθεση των εντόμων σε μικροκυστίνες, όπως παρομοίως περιγράφηκε κατά τους Singh *et. al* (2002), όπου παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας σε νύμφες κουνουπιών και λεπιδόπτερων αντίστοιχα.

Τέλος, στην ερευνητική αυτή εργασία αξιολογήθηκε το κριτήριο επιλογής, το οποίο έδειξε πως τα έντομα προτίμησαν και τα δυο είδη σπόρων αραβόσιτου (σπόροι από το αγροτεμάχιο και σπόροι του εργαστηρίου εντομολογίας). Παρόμοια πειράματα συμπεριφοράς όσον αφορά την χρήση μικροκυστινών δεν έχουν πραγματοποιηθεί.

Παρ' όλα αυτά όμως, οι όποιες διαφορές είναι πιθανόν να μη σχετίζονται άμεσα με αυτό καθ' αυτό με την ύπαρξη μικροκυστινών στους σπόρους που χρησιμοποιήθηκαν, αλλά με το έμμεσο αποτέλεσμα, δηλαδή τον τύπο που προϊόντος που παρήχθη τελικά (καλαμπόκι). Έτσι, τόσο η θνησιμότητα, όσο και η παραγωγή απογόνων και η προτίμηση μπορεί να οφείλονται σε συγκεκριμένα αγρονομικά ή και άλλα χαρακτηριστικά κάποιων σπόρων, π.χ. το ειδικό βάρος ή και το μέγεθος του σπόρου ή ακόμα και την περιεκτικότητα των σπόρων σε χαρακτηριστικά επιθυμητά από τα έντομα. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν δεν καλλιεργήθηκαν ακριβώς με τις ίδιες συνθήκες (π.χ. οι σπόροι Εργαστηρίου προέρχονταν από προηγούμενες καλλιεργητικές περιόδους) και για αυτό το λόγο οι όποιες διαφορές δεν είναι άμεσα συγκρίσιμες και ερμηνεύσιμες ως προς τις επεμβάσεις που έλαβαν χώρα σε αυτή τη μελέτη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Aboal M., Puig M. A. (2009). Microcystin production in *Rivularia colonies* of calcareous streams from Mediterranean Spanish basins. *Algol. Stud.* 130 39–52. 10.1127/1864-1318/2009/0130-0039
- Aitken A. (1975). Insect Travelers, I: Coleoptera, Techn. Bull. 31, H.M.S.O. London.
- Anonymous, 2013. Maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky. (Online), Canadian Grain Commission, Government of Canada.
(Available at: <http://www.grainscanada.gc.ca/storage-entrepot/pip-irp/mw-cr-eng.htm>)
- Athanassiou C, Kavallieratos N, Rumbos C, Stavropoulos D, Boukouvala M, Nika E. 2017. Laboratory studies on the behavioral responses of *Tribolium confusum* and *Ephestia kuehniella* to surfaces treated with diatomaceous earth and spinosad formulations. *Journal of Pest Science*. Springer-Verlag GmbH Germany
- Banack, S.A., Cox, P.A., 2003. Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes Implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology* 61, 387–389.
- Bell, R. J. and Watters, F. L., 1982. Environmental factors influencing the development and rate of increase of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) on stored maize. *J. stored Prod. Res.* 18, 131-142.
- Bernton, H. S. & Brown, H., 1964. Insect allergy-Preliminary studies of the cockroach. *Allerg.*, 35, 506.
- Bernton, H.S., Brown, H., 1964. Insect as potential sources of ingestant allergens.

- Berry J. P., Gantar M., Perez M. H., Berry G., Noriega F. G. (2008). Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. *Mar. Drugs* 6 117–146. 10.3390/md20080007
- Berry, J.P., M. Gantar, M.H. Perez, G. Berry and F.G. Noriega. 2008. Cyanobacterial toxins and allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides, and insecticides. *Mar. Drugs* 6:117-146
- Beyer, D., Tándor, I., Kónya, Z., Bátori, R., Roszik, J., Vereb, G., Erdődi, F., Vasas, G., M-Hamvas, M., Jambrovics, K., Máthé, C., 2012. Microcystin-LR, a protein phosphatase inhibitor, induces alterations in mitotic chromatin and microtubule organization leading to the formation of micronuclei in *Vicia faba*. *Ann. Bot.* 110, 797–808. doi:10.1093/aob/mcS154
- Bibo, L., Yan, G., Bangding, X., Jiantong, L., & Yongding, L. (2008). A laboratory study on risk assessment of microcystin-RR in cropland. *Journal of environmental management*, 86(3), 566-574.
- Boxall, R.A., 2002. Damage and loss caused by the Larger Grain Borer *Prostephanus truncatus*. *Integr. Pest. Manag. Rev* 7, 105-121.
- CABI. 2010. *Sitophilus zeamais* (maize weevil) datasheet. Crop Protection Compendium, 2010 Edition. CAB International Publishing. Wallingford, UK.
- Carmichael W.W. and An J., 1999. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Natural Toxins* 7: 377–385.
- Carmichael W.W., 1997. The cyanotoxins. In, *Advances in Botanical Research*. Academic Press Ltd, 27:211-255
- Carmichael, W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445-459.
- Carmichael, W.W., 1997. The Cyanotoxins. In, *Advances in Botanical Research* 27: 211-255. Academic Press Ltd.

- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins (Caruaru syndrome). *Environmental Health Perspectives* 109: 663-668.
- Castenholz, R.W. 2001. General characteristics of the cyanobacteria. In: Boone DR, Castenholz RW (Ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Springer-Verlag, New York, p 474-487.
- Castenholz, R.W., 2001. Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria. Second Edition. G. Garrity, D. R. Boone, and R. W. Castenholz (eds.) Springer-Verlag, New York.
- Chen J, Song L, Dai J, Gan N, Liu Z. 2004. Effects of microcystins on the growth and the activity of the superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon* 43: 393 – 400.
- Chen, J., Han, F.X., Wang, F., Zhang, H., Shi, Z., 2012. Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 193–199. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.09.022
- Chen, J., Han, F.X., Wang, F., Zhang, H., Shi, Z., 2012. Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 193–199. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.09.022
- Chittenden, F. H., 1911. Papers on insects affecting stored products. The lesser grain borer. The larger grain borer. *Bull. Bur. Ent. U.S. Dep. Agric.* 96, 29-52.
- Chorus, I., 2001. Cyanotoxins, occurrence, causes, consequences. Berlin: Springer.
- Chorus, I., Bartram, J., (Eds.) 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to public health consequences, monitoring and management (p. 416). London: E&FN Spon, WHO.

- Codd G.A., 2000. Cyanobacterial toxin, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering* 16: 51–60.
- Codd, G. A., Metcalf, J. S., & Beattie, K. A., 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*, 37(8), 1181-1185.
- Codd, G.A., Bell, S.G, Brooks, W.P., 1989. Cyanobacterial toxins in water. *Water Science and Technology* 21(3), 1-13
- Corbel S., Mougin C., Bouaïcha N., 2014. Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96 1–15.
10.1016/j.chemosphere.2013.07.056
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100, 3380-3383.
- Crush, J. R., Briggs, L. R., Sprosen, J. M., & Nichols, S. N., 2008. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environmental toxicology*, 23(2), 246-252.
- Dawson, R.M., 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36 (7): 953–962.
- Delgado N. M. and Hernandez Luna R. (1951) Control de1 gorgojo de la semilla de maiz (*Prostephanus truncatus* (Horn)). *Inst. National Invest. Agric., Fol. Misc.* 4, 2629.
- Dietrich D, Hoeger S., 2005. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicology and Applied Pharmacology* 203:273–289.

- Ding, W., Ong, C., 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEBS Microbiology Letters* 220: 1–7.
- Doumbia M, Douan BG, Kwadjo KE, Kra DK, Marte IV, Dognogo M. 2014. Effectiveness of diatomaceous earth for control of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium castaneum* and *Palorus subdepressus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Stored Prod Res.* 57:1–5.
- Duy TN, Lam PKS, Shaw GR, and Connell DW., 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (Blue- Green Algal) toxins in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 163: 113–186.
- El Khalloufi, F., Oufdou, K., Lahrouni, M., El Ghazali, I., Saqrane, S., Vasconcelos, V., Oudra, B., 2011. Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa*-*Rhizobia* symbiosis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 431–438. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.10.006
- Ernst B, Dietz L, Hoeger SJ, Dietrich DR., 2005. Recovery of MC-LR in fish liver tissue. *Environmental Toxicology* 20:449–458.
- Ettoumi, A., El Khalloufi, F., El Ghazali, I., Oudra, B., Amrani, A., Nasri, H., Bouaïcha, N., 2011. Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health. In: Kattel, G. (Ed.), *Zooplankton and Phytoplankton: Types, Characteristics and Ecology*. Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 1–34.
- Falconer IR., 1999. An overview of problems caused by toxic bluegreen algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology* 14:5–12.
- Farrell, G., Schulten, G.G.M., 2002. Larger grain borer in Africa; a history of efforts to limit its impact. *Integr. Pest. Manag. Rev* 7, 67-84.
- Farrell, J. 2009. Diagnostic Methods for Maize weevil *Sitophilus zeamais*. PaDIL-Plant Biosecurity Toolbox.

- Fields, P.G., Xie, Y.S., Hou, X., 2001b. Repellent effect of pea (*Pisum sativum*) fractions against stored-product insects. *J Stored Prod Res* 37:359–370
- Fischer W.J., Garthwaite I., Miles C.O., Ross K.M., Aggen J.B., Chamberlin A.R., Towers N.R., Dietrich D.R., 2001. Congener independent immunoassay for microcystins and nodularins. *Environmental Sciences and Technologies* 35: 4849-4856.
- Fischer, W.J. and Dietrich, D.R., 2000. Toxicity of the cyanobacterial cyclic heptapeptide toxins microcystin-LR and-RR in early lifestages of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Aquatic Toxicology* 49: 189–198.
- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P., Walsby, A.E. 1973. The blue–green algae. Academic Press, London, New York.
- Fromme, H., Koehler, A., Krause, R., Fuehring, D., 2000. Occurrence of cyanobacterial toxins-microcystins and anatoxin-a-in Berlin water bodies with implications to human health and regulations. *Environmental Toxicology* 15: 120– 130.
- Funari, E. & Testai, E., 2008. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 38 97–125. 10.1080/10408440701749454
- Germinara, GS., De Cristofaro, A., Rotundo, G., 2008. Behavioral responses of adult *Sitophilus granarius* to individual cereal volatiles. *J Chem Ecol.* 34:523–529.
- Gialis, S., & Laspidou, C. S., 2014. Lake Karla and the contradictory character of Greek environmental policies: a brief historical overview. In IWA-regional symposium on water, wastewater and environment (pp. 22-24).
- Giles, P. H. and Leon, O. J., 1975. Infestation problems in farm-stored maize in Nicaragua. *Proc. Ist Inr. Wkg Conf Stored-Prod. Ent.*, Savannah, Georgia, U.S.A. 1974, pp. 68-76.

- Giles, P. H., 1975. Annual report 1974 on the activities of SEPRAL and the Grain Storage Extension Group. Rep. Section de Productos Almacenados (SEPRAL). Ministerio de Agricultura y Ganaderia, Nicaragua.
- Goldberg, J., Huang, H.-B., Kwon, Y.-G., Greengard, P., Nairn, A.C., Kuriyan, J. 1995. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376, 745-753.
- Golob, P. and Hodges, R. J., 1982. Study of an outbreak of *Prostephanus truncatus* (Horn) in Tanzania. Report G. 164. Trop. Prod. Inst. London.
- Guo, S., Zhang, W., Liang, J., You, C., Geng, Z., Wang, C., Du, S., 2016 Contact and repellent activities of the essential oil from *Juniperus formosana* against two stored product insects. *Molecules* 21:504
- Hayes, P.K. 1988. Gas vesicles: chemical and physical properties *Methods Enzymol.*, 167, pp. 213–222
- Hodges, D.C., 1983. The Population Biology of the Greater Grain Borer, *Prostephanus truncatus* (Horn). Ph.D. Thesis. University of Reading, U.K.
- Hodges, R. J., 1986. The biology and control of *Prostephanus truncatus* (horn) (coleoptera: Bostrichidae) a destructive storage pest with an increasing range. *J. stored Prod. Res.* Vol. 22, No. 1, pp. 1-14, Printed in Great Britain.
- Honkanen, R. E., Zwillers, J., Moore, R. A., Daily, S. L., Khatra, B. S., Dukelow, M. and Boynton, A. L., 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* 265: 19401-19404.
- Hori, M., 2003. Repellency of essential oils against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae). *Appl Entomol Zool* 38:467–473
- Howard D. C. (1984) The ability of *Prostephanus truncatus* to breed on different maize varieties. *Proc. GASGA Workshop on the Larger Grain Borer*

- Prostephanus truncatus, 24-25 February, 1983, TPI, Slough. Publ. GTZ, Eschborn, pp. 17-31.
- Howard D. C., 1483. The population biology of the greater grain borer Prostephanus truncatus (Horn). Ph.D. thesis. University of Reading.
- Ibelings, B.W., Bruning, K., de Jonge, J., Wolfstein, K., Dionisio, P.L.M., Postma, J., Burger, T., 2005. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microbial Ecology* 49(4):487-500.
- Ibelings, B.W., Chorus, I. 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, 150, 177-192.
- Izaguirre G., Jungblut A. D., Neilan B. A., 2007. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. *Water Res.* 41 492–498. 10.1016/j.watres.2006.10.012
- Jacobs, S. and D. Calvin. 2001. Weevils on Stored Grain. College of Agricultural Sciences, Department of Entomology, Pennsylvania State University. (Also available at <http://ento.psu.edu/extension/factsheets/weevils-on-stored-grain>)
- Jang M.-H., Kyong H., Takamura N., 2007. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon* 49 727–733. 10.1016/j.toxicon.2006.11.017
- Kaebernick M., Neilan B. A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35 1–9. 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00782.x
- Kavallieratos NG, Athanassiou CG, Korunic Z, Mikeli NH., 2015. Evaluation of three novel diatomaceous earths against three stored-grain beetle species on wheat and maize. *Crop Prot.* 75:132–138.

- Komárek, J. & Anagnostidis, K., 1999. Cyanoprokaryota. 1. Chroococcales. In: Süßwasserflora von Mitteleuropa. Begründet von A. Pascher. Band 19/1. (Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H. & Mollenhauer, D. Eds), pp. 1-548. Heidelberg & Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag.
- Krienitz L., Ballot A., Wiegand C., Kotut K., Codd G. A., Pflugmacher S., 2002. Cyanotoxin-producing bloom of *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena discoidea* and *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) in Nyanza Gulf of Lake Victoria, Kenya. *J. Appl. Bot.* 76 179–183. 10.1128/AEM.05587-11
- Kos, P., Gorzo, G., Suranyi, G., Borbely, G., 1995. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Anal. Biochem.* 225, 49–53.
- Laznik Ž, Tóth T, Lakatos T, Vidrih M, Trdan S. 2010. The activity of three new strains of *Steinernema feltiae* against adults of *Sitophilus oryzae* under laboratory conditions. *J Food Agric Environ.* 8:150–154.
- Laznik Ž, Vidrih M, Trdan S. 2012. Efficacy of four essential oils against *Sitophilus granarius* (L.) adults after short-term exposure. *Afr J Agric Res.* 21:3175–3181.
- Lesne, P., 1897. Revision des Coleoptères de la famille des Bostrichides. *Ann. Soc. ent. Fr.* LXVI, 319-350. (Auril 1898).
- Levizou, E., Statiris, G., Papadimitriou, T., Laspidou, C. S., & Kormas, K. A., 2017. Lettuce facing microcystins-rich irrigation water at different developmental stages: Effects on plant performance and microcystins bioaccumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 193-200.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J., 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon* 42: 85–89.
- Liarte S, Ubero-Pascal N, García-Ayala A, Puig M. 2014. Histological effects and localization of dissolved microcystins LR and LW in the mayfly *Ecdyonurus angelieri* Thomas (Insecta, Ephemeroptera). *Toxicon* 92 (2014) 31e35

- Licciardello. F., Muratore. G., Suma. P., Russo. A., Nerin. C., 2013. Effectiveness of a novel insect-repellent food packaging incorporating essential oils against the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Innov Food Sci Emerg Technol* 19:173–180
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11, 591–592
- Liu. ZL., Ho. SH., 1999. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsh. and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J Stored Prod Res* 35:317–328
- Longstaff, B. C., 1981. Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae): A critical review. *Protection Ecology*, 2: 83-130.
- Lyon, W. F., 1991. Confused and Red Flour Beetles. (Online), Extension Fact Sheet, Department of Entomology, Ohio State University.
- MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P. and Codd, G. A., 1990. Cyanobacterial microcystin- LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264: 187-192.
- Magalhães, V. F., Soares, R., & Azevedo, S., 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39: 1077–1085.
- Marsaro Junio, A.L., Noemberg Lazzari, S.M., deSouza, J.L., Lazzari, F.A., Candido, L.M.B., 2007. Influence of different fertilization systems on nutritional composition of corn *Zea mays* L. (Poaceae) and the effects to attack of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) to storage product. *Semin-Cienc Agrar*. 28:51–63.

- McElhiney J, Lawton LA, Leifert C., 2001. In vestigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon* 39: 1411–1420.
- Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Pflugmacher, S., Codd, G.A., 2000. Immunocrossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *FEMS Microbiology Letters* 189: 155-158.
- Miller, M. A., Kudela, R. M., Mekebri, A., Crane, D., Oates, S. C., Tinker, M. T., et al. 2010. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to Sea Otters. *PLoS ONE* 5:e12576 10.1371/journal.pone.0012576
- Mohamed, Z.A, Carmichael, W.W., Hussein, A.A., 2003. Estimation of microcystin in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ. Toxicol.* 18, 137-141.
- Molot, L. A., Watson, S. B., Creed, I. F., Trick C. G., McCabe, S. K., Verschoor, M. J., 2014. A novel model for cyanobacteria bloom formation: the critical role of anoxia and ferrous iron. *Freshwater Biol.* 59 1323–1340. 10.1111/fwb.12334
- Mur, L.R., Skulberg, O.M., Utkilen, H. 1999. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartram J (Eds) *Toxic Cyanobacteria in Water*, World Health Organization, E & FN Spon, London, pp 179-209.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sc.* 101, 12228–12231.
- Oikonomou, A., Katsiapi M., Karayanni H., Moustaka-Gouni M., Kormas K., 2012. Plankton microorganisms coinciding with two consecutive mass fish kills in a newly reconstructed lake. *The Scientific World Journal* doi:10.1100/2012/504135

- Olivero-Verbel, J., Tirado Ballestas, I., Caballero Gallardo, K., Stashenko, E.E. 2013. Essential oils applied to the food act as repellents toward *Tribolium castaneum*. *J Stored Prod Res* 55:145–147
- Papadimitriou, T., Kagalou, I., Stalikas, C., Pilidis, G., Leonardos, I. D., 2012. Assessment of microcystin distribution and biomagnifications in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake. *Ecotoxicology* 21 1155–1166. 10.1007/s10646-012-0870-y
- Papadimitriou, T., Kormas, K., Dionysiou, D. D., & Laspidou, C., 2016. Using H₂O₂ treatments for the degradation of cyanobacteria and microcystins in a shallow hypertrophic reservoir. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(21), 21523-21535.
- Pearl, H.W., 1996. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia* 35: 25–35.
- Peuthert, A., Pflugmacher, S., 2010. Influence of the cyanotoxin microcystin-LR on tocopherol in Alfalfa seedlings (*Medicago sativa*). *Toxicon* 56, 411–417. doi:10.1016/j.toxicon.2010.04.00
- Pflugmacher, S., 2007. Reduction in germination rate and elevation of peroxidase activity in *Zea mays* seedlings due to exposure to different microcystin analogues and toxic cell free cyanobacterial crude extract. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. Volume 81, Issue 1, June 2007, Pages 45-48
- Pflugmacher, S., Ame, V., Wiegand, C., Steinberg, C., 2001. Cyanobacterial toxins and endotoxins: their origin and their ecophysiological effects in aquatic organisms. *Wasser und Boden* 53, 15–20.
- Pflugmacher, S., Aulhorn, M., Grimm, B., 2007a. Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. *New Phytol.* 175, 482–489. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02144.x

- Pflugmacher, S., Jung, K., Lundvall, L., Neumann, S., Peuthert, A., 2006. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* Volume 25, Issue 9, September 2006, Pages 2381-2387.
- Prieto, A., Campos, A., Cameán, A., Vasconcelos, V., 2011. Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1973–1980. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.06.009
- Ramirez Genel, M., 1960b. Infestacion de campo por insectos de granos almacenados. Observaciones en maiz de la mesa central y de tropic0 en 1959. *Agric. fee. Mex.* 10, 32-35.
- Ramirez Martinez, M. and Silver, B. J., 1983 Deterioration and damage produced in corn grains in Mexico by *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). *Biodeferiorufion*, Vol. 5 (Edited by Oxley T. A. and Barry S.), pp. 582-59 1. John Wiley, N.Y.
- Rastogi, R. P., Sinha, R. P., Incharoensakdi, A. 2014. The cyanotoxin-microcystins: current overview. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 13 215–249. 10.1007/s11157-014-9334-6
- Reis SL, Mantello AG, Macedo JM, Gelfuso EA, da Silva CP, Fachin AL, Cardoso AM, Beleboni RO (2016) Typical monoterpenes as insecticides and repellents against stored grain pests. *Molecules* 21:258
- Reynolds, C.S., Walsby, A.E. 1975. Water–blooms. *Biol. Rev.* 50, 437–481.
- Rojht H, Horvat A, Athanassiou CG, Vayias BJ, TomanovićŽ , Trdan S. 2010. Impact of geochemical composition of diatomaceous earth on its insecticidal activity against adults of *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *J Pest Sci.* 83:429–436.

- Romanowska-Duda Z., Mankiewicz J., Tarczynska M., Walter Z., Zalewski M., 2002. The effect of toxic cyanobacteria (blue-green algae) on water plants and animal cells. *Polish Journal of Environmental Studies* 11: 561- 566.
- Runnegar, M.T., Kong, S., Berndt, N. 1993. Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. *Am. J. Physiol.* 265, G224-G230.
- Runnegar, M.T.C., Gerdes, R.G., Falconer, I.R., 1991. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon* 29: 43–51.
- Saqrane, S., El Ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., Vasconcelos, V., 2008. Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *J. Environ. Sci. Health. B.* 43, 443–451. doi:10.1080/03601230802062307
- Saqrane, S., Ouahid, Y., El Ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., del Campo, F.F., 2009. Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. *Toxicon* 53, 786–796. 785doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.028 786
- Shires, S. W., 1979. Influence of temperature and humidity on survival, development period and adult sex ratio in *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). *J. stored Prod. Res.* 15, 5-10.
- Singh, Dhananjaya P., Ashok Kumar, and M. B. Tyagi, 2002. Biotoxic Cyanobacterial Metabolites Exhibiting Pesticidal and Mosquito Larvicidal Activities. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13(1), 50–56.
- Sipia, V., Lahti, K., Kankaanpaa, H., Vuorinen, P., & Meriluoto, J., 2002. Screening for cyanobacterial hepatotoxins in herring and salmon from the Baltic Sea. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 5(4): 451–456.

- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds). Toxic Cyanobacteria in Water. World Health Organization, E & FN Spon, London and New York, pp. 41-110.
- Steele, J.C., McGeer, P.L., 2008. The ALS/PDC syndrome of Guam and the cycad hypothesis. *Neurology* 70, 1984–1990.
- Sukenik, A., Quesada, A., Salmaso, N. 2015. Global expansion of toxic and non-toxic cyanobacteria: effect on ecosystem functioning. *Biodivers. Conserv.* 24 889–908. 10.1007/s10531-015-0905-9
- Sunderland, M. R., Cruickshank, R. H. 2016. Investigations into the toxic and repellent effects of propiconazole on the wool-digesting carpet beetle larvae *Anthrenocerus australis* (Coleoptera: Dermestidae). *J Insect Behav* 29:57–68
- Trematerra P, Fontana F, Mancini M, Sciarretta A. 1999. Influence of intact and damaged cereal kernels on the behaviour of rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.)
- Trematerra P, Ianiro R, Athanassiou CG, Kavallieratos NG. 2013. Behavioral responses of *Sitophilus zeamais* Motschulsky adults to conditioned grain kernels. *J Stored Prod Res.* 53:77–81.
- Trematerra P. 2009. Preferences of *Sitophilus zeamais* to different types of Italian commercial rice and cereal pasta. *Bull Insectol.* 62:103–106.
- Tripathi, A. K., Prajapati, V., Aggarwal, K. K., Khanuja, S. P. S., Kumar, S., 2000. Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored-product beetles. *J Econ Entomol* 93:43–47
- Turinek M, Bavec F, Repič M, Bavec M, Athanassiou C, Turinek M, Leitner E, Trematerra P, Trdan S. 2016. Mortality, progeny production and preference of *Sitophilus zeamais* adults to wheat from integrated and alternative production systems. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 66:5, 443-451.

- Van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M., 1995. *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vepritskii A. A., Gromov B. V., Titova N. N., Mamkaeva K. A. (1991). Production of the antibiotic algicide cyanobacterin LU-2 by a filamentous cyanobacterium *Nostoc* sp. *Mikrobiologia* 60 21–25.
- W.H.O., 1998. Cyanobacterial toxins: microcystin-LR. In: *Guidelines for drinking water quality. 2nd Edition, Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 95–110.
- W.H.O., 1998. *Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information*. World Health Organization, Geneva, 1998.
- Whitton, B. A. & Potts, M., 2000. Introduction to the cyanobacteria. In *The Ecology of Cyanobacteria*, pp. 1-11. Edited by B. A. Whitton & M. Potts. Dordrecht: Kluwer Academic.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Μπουχέλος Κ. (1996). Έντομα αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Παπαδημητρίου Θ. 2010. Επιπτώσεις των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών σε υδρόβιους μικροοργανισμούς. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Διδακτορική Διατριβή.
- Σταμόπουλος, Δ. Κ. 1999. Έντομα αποθηκών, μεγάλων καλλιεργειών και λαχανικών. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, σελ. 13.
- Σταμόπουλος, Δ. Κ. 2013. Εχθροί αποθηκευμένων προϊόντων, μουσείων και κατοικιών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος.

Χαμόγλου, Μ., 2013. Επιδράσεις υδρολογικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στη συγκέντρωση των μικροκυστινών: μια μαθηματική προσομοίωση στη λίμνη Κάρλα. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Μεταπτυχιακή Διατριβή.

Χριστόπουλος Α., 2009. Σχέδιο δράσης για τη Ζώνη Ειδικής Προστασίας «GR1430007 Περιοχή ταμιευτήρων πρώην Λίμνης Κάρλας». Δημαλέξης, Α. Μπούσμπουρας, Δ., Καστρίτης, Θ., Μανωλόπουλος Α. (Επιστημονικός συντονισμός προγράμματος). Πρόγραμμα επαναξιολόγησης 69 σημαντικών περιοχών για τα πουλιά για τον χαρακτηρισμό τους ως Ζωνών Ειδικής Προστασίας της Οрниθοπανίδας. ΥΠΕΧΩΔΕ, Αθήνα, σελ 4-5